

Interacciones entre el ambiente lumínico y la producción de defensas contra herbívoros y patógenos en plantas

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Patricia Verónica Demkura

Licenciada en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires - 2006

Lugar de trabajo: Instituto de investigaciones fisiológicas y ecológicas vinculadas a la
agricultura (IFEVA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Carlos Luis Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD (Oregon State University, U.S.A)

Consejero de Estudios

Jorge Alberto Zavala

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor Rerum Naturalis (Friedrich Schiller Universität, Alemania)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Carlos Luis Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD (Oregon State University, U.S.A)

JURADO

Paula Casati

Licenciada en Biotecnología (Universidad de Rosario)

Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Rita María Ulloa

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

María Rosa Marano

Licenciada en Bioquímica (Universidad Nacional del Litoral)

Dr. en Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario)

Fecha de defensa de la tesis: 19 de Abril de 2013

A Gabi y Nahuel, porque el primer recuerdo que tengo de esta tesis es un viaje a la selva, repleto de dragones.

Prometo llevar repelente para dragones en el próximo viaje.

A Valentina, la brujita más sabia y valiente que conozco.

Agradecimientos

Las palabras que siguen seguro van a parecer extensas, pero constituyen una de las partes de este trabajo que me dio mayor felicidad escribir y una minimísima devolución a personas que fueron muy importantes en el transcurso de este trabajo. Espero no estar olvidándome de nadie y espero poder retribuir algún día todo lo que recibí durante estos años de tesis.

A mis papás y a mis hermanas, por acompañarme siempre, por guiarme, por dejarme andar y por estar siempre por acá nomás, por más que estén por allá lejos. Me siento orgullosa y feliz de ser parte de esta familia.

A Ricardo, por las charlas, las discusiones y los consejos; y por demostrarme que los físicos son mucho más que malas personas que se divierten encerrando gatos adentro de cajas.

A esas otras hermanas que me dió la vida, Fabi, Romi, Nené. Qué bueno es saber que decir: "te conozco hace una década" no es síntoma de vejez sino de que estamos apenas al comienzo de una gran amistad :).

A Lu, a Amelie, a Ana(lía) y a Mica, por una lindísima amistad a la que el espacio académico le quedó chiquitísimo y sigue creciendo paredes afuera.

A mi director, Carlos Ballaré, por la guía, por la paciencia y por estar siempre dispuesto a discutir ideas y a romper esquemas, y por sobre todo por permitirme la independencia y la autonomía en el trabajo.

A mi consejero de estudios, Jorge Zavala, por el apoyo y por la extremadamente buena predisposición que tuvo todos estos años.

A Javier Moreno, por la generosidad, por toda la ayuda que me brindó durante el desarrollo de este trabajo, por la buena onda y por seguir dispuesto a discutir mis resultados y mis cuestionamientos aún a la distancia.

A los integrantes del laboratorio de UV con los que compartí un montonazo de momentos y experiencias: a Miriam Izaguirre y Carlos Mazza por la infinita paciencia con mis primeros pasos, por la enseñanza y por el ejemplo, a Miriam Cargnel por la inmensa ayuda y aporte de experiencia propia sin los cuales muchos de los experimentos de esta tesis no hubiesen sido posibles, a Mercedes Keller por los incontables momentos compartidos, y a los "viejitos" y "nuevitos", Ana Zima, Fedra Cuestas Acosta, Melisa Leone e Ignacio Cerrudo, por el entusiasmo, por la iniciativa y por el buen humor que hicieron más amenas las horas de trabajo.

A Claudia y a Mica, por haber triunfado escitosamente contra todos mis athenados contra la lengüa española y el abuso de palhavra en esta thesis....esepto en éste parafho :D

Al IFEVA, por brindarme un hermoso espacio de trabajo para el desarrollo de esta tesis, por la posibilidad de interactuar todos los días con gente que trabaja en otras disciplinas, lo cual fue una experiencia muy enriquecedora.

A todos los integrantes del "grande", especialmente a Carlitos, a Santi, a Vero, a Renata, a Romi, a María y a Eli por la ayuda con los protocolos que eran nuevos para mí, por las discusiones de trabajo y sobre todo por los viernes.

A la gente del "sucio" y de más allá, Wally, Carlitos, Laura, Mirta, Romi Cavagnaro y Martita por la ayuda técnica, por las charlas y los mates. Un agradecimiento especial a la familia Tornese-López, Roberto, Marisol, Andre y Melina, por la ayuda en cuestiones técnicas y administrativas, pero sobre todo por la generosidad y por la enorme calidad humana.

A la Cátedra de Química del CBC, a los coordinadores y docentes con los que tuve el placer de compartir un espacio de trabajo, discusión y aprendizaje que ha sido sumamente valiosos todos estos años. A Willy especialmente por la generosidad, por la buena voluntad y por enseñarme todos los días a ser mejor como docente, sos un genio.

A los amigos de la facu, que siguieron siempre presentes todos estos años y fueron y son parte fundamental de la vida diaria post-trabajo: A Guillo y a Mecha (sobre todo por esa inolvidable tarde de canciones, Uds. saben cual), a Agus (en especial por unos mates muy necesarios en un momento lleno de dudas), Lei, Jero y Claudia por incontables mates, comidas, salidas y festejos. A Mariana Massó, por estar siempre con la palabra necesaria en el momento preciso. A Darrem, por ser un colega y un amigo en toda ley, te debo un millón. A Evelin, miles de gracias por la franqueza, por la cuota de buen humor en los peores momentos y por la causa común. DNíña Proteá para todos nosotros :)

A los amigos extra-académicos que hacen mi día a día (y que me bancan :D):

A Kato, por haber sido La Persona todos estos últimos meses :D.

Al Monito, por los claros, los oscuros y por todo el espectro de colores :)

A la Dra. Carozzi, por la interdisciplinariedad (creo que acabo de inventar una palabra), por ser maestra y amiga.

A Manu, por un espacio y una amistad que me cambiaron la vida por completo, espero que esto sea algo que perdure con el tiempo.

A Nadia, Ana, Anita, Manu, Isa, Betty, Juan, Felix, Quequín, Leo, Lucas, Alfonso y todos los que hacen que los pequeños momentos sean lo mejor de la vida.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

El trabajo presentado en esta tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones:

Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballaré CL (2010) Jasmonate –dependent and independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**: 1084–1095.

Demkura PV, Ballaré CL (2012) UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant* **5**: 116–126.

Índice general

| | |
|---|------|
| Dedicatoria | i |
| Agradecimientos | ii |
| Declaración..... | iv |
| Publicaciones derivadas de la tesis | v |
| Índice general | vi |
| Índice de cuadros | vii |
| Índice de figuras | viii |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |

Capítulo 1: Introducción general , objetivos e hipótesis

| | |
|----------------------------|----|
| Introducción general | 1 |
| Objetivos | 14 |
| Hipótesis..... | 15 |

Capítulo 2: Efectos de la radiación UV-B sobre la producción de compuestos de defensa: Rol de los jasmonatos en la producción de defensas inducibles por UV-B en *Nicotiana attenuata*

| | |
|----------------------------|----|
| Introducción..... | 17 |
| Materiales y métodos | 22 |
| Resultados | 34 |
| Discusión..... | 47 |
| Conclusiones..... | 53 |

Capítulo 3: Efectos de la radiación UV-B sobre la vía de señalización de JA y la producción de defensas en *Arabidopsis thaliana*. Rol del fotorreceptor UVR8 en la inducción de defensas

| | |
|----------------------------|-----|
| Introducción..... | 55 |
| Materiales y métodos | 69 |
| Resultados | 76 |
| Discusión..... | 97 |
| Conclusiones..... | 101 |

Capítulo 4: Discusión general..... 103

Bibliografía 115

Apéndice..... 139

Índice de cuadros

Capítulo 2: Efectos de la radiación UV-B sobre la producción de compuestos de defensa: Rol de los jasmonatos en la producción de defensas inducibles por UV-B en *Nicotiana attenuata*

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión génica | 32 |
|--|----|

Capítulo 3: Efectos de la radiación UV-B sobre la vía de señalización de JA y la producción de defensas en *Arabidopsis thaliana*. Rol del fotorreceptor UVR8 en la inducción de defensas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión génica | 75 |
|--|----|

Índice de figuras

Capítulo 1: Introducción general , objetivos e hipótesis

| | |
|--|----|
| Figura 1: Señales del ambiente percibidas por las plantas | 1 |
| Figura 2: Distribución espectral de la radiación solar | 2 |
| Figura 3: Clasificación de la radiación ultravioleta | 3 |
| Figura 4: Defensas comunes en plantas | 7 |
| Figura 5: Esquema de la vía de síntesis de JA y otras oxilipinas..... | 8 |
| Figura 6: Esquema de interacciones entre las respuestas al UV-B y el ataque de herbívoros o patógenos..... | 12 |

Capítulo 2: Efectos de la radiación UV-B sobre la producción de compuestos de defensa: Rol de los jasmonatos en la producción de defensas inducibles por UV-B en *Nicotiana attenuata*

| | |
|--|----|
| Figura 1: <i>Nicotiana attenuata</i> | 18 |
| Figura 2: Esquema de la respuesta de defensa en <i>N. attenuata</i> | 19 |
| Figura 3: Arreglo de lámparas utilizado en los ensayos de invernáculo | 24 |
| Figura 4: Arreglo de filtros utilizado en los ensayos de campo..... | 25 |
| Figura 5: Detalle del tratamiento de herbivoría simulada | 26 |
| Figura 6: Efectos del UV-B y la herbivoría simulada sobre la acumulación de compuestos fenólicos solubles..... | 35 |
| Figura 7: Perfil cromatográfico del extracto foliar de <i>N. attenuata</i> | 36 |
| Figura 8: Perfil de compuestos fenólicos del grupo 1 (flavonoides y ácido clorogénico)..... | 37 |
| Figura 9: Perfil de compuestos fenólicos del grupo 2 (poliaminas conjugadas)..... | 38 |
| Figura 10: Cuantificación de DTGs totales | 39 |
| Figura 11: Expresión de genes en respuesta al UV-B y la herbivoría simulada..... | 40 |
| Figura 12: Cuantificación de JAs en respuesta a UV-B y herbivoría simulada..... | 42 |
| Figura 13: Efecto del UV-B sobre la sensibilidad a JA | 44 |
| Figura 14: Detalle de hojas de <i>N. attenuata</i> atacadas por thrips..... | 45 |
| Figura 15: Efecto de la exposición a UV-B sobre la herbivoría natural en <i>N. attenuata</i> | 46 |

Capítulo 3: Efectos de la radiación UV-B sobre la vía de señalización de JA y la producción de defensas en *Arabidopsis thaliana*. Rol del fotorreceptor UVR8 en la inducción de defensas

| | |
|---|----|
| Figura 1: <i>Arabidopsis thaliana</i> | 57 |
| Figura 2: Esquema de acción de los represores JAZ..... | 59 |
| Figura 3: Vía de síntesis de compuestos fenólicos en <i>A. thaliana</i> | 62 |
| Figura 4: Glucosinolatos principales de <i>A. thaliana</i> | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 5: Vía de síntesis de glucosinolatos indólicos | 66 |
| Figura 6: Arreglo de lámparas para los tratamientos de UV-B | 70 |
| Figura 7: Cámaras húmedas utilizadas en los bioensayos con <i>B. cinerea</i> | 72 |
| Figura 8: Efecto de la radiación UV-B sobre el desarrollo de larvas de <i>S. frugiperda</i> | 77 |
| Figura 9: Efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia a <i>B. cinerea</i> | 79 |
| Figura 10: Efecto de la radiación UV-B y la aplicación de MeJA sobre la expresión génica | 82 |
| Figura 11: Efecto de la radiación UV-B y la aplicación de MeJA en simultáneo | 84 |
| Figura 12: Efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia a <i>B. cinerea</i> en mutantes afectadas en la señalización de JA | 85 |
| Figura 13: Efecto de la radiación UV-B sobre la producción de glucosinolatos | 87 |
| Figura 14: Efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de <i>PAD3</i> | 89 |
| Figura 15: Efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia a <i>B. cinerea</i> en mutantes afectadas en la producción y procesamiento de glucosinolatos indólicos y camalexina | 90 |
| Figura 16: Efecto de la radiación UV-B y el MeJA sobre los fenólicos de <i>A. thaliana</i> | 92 |
| Figura 17: Efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia a <i>B. cinerea</i> en mutantes afectadas en la producción de compuestos fenólicos | 96 |

Capítulo 4: Discusión general

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Mecanismo general de respuesta al ataque de herbívoros o patógenos necrótrofos | 106 |
|--|-----|

Apéndice

| | |
|--|-----|
| Figura A1: Perfil de compuestos fenólicos en <i>N. attenuata</i> en respuesta a distintos tratamientos de herbivoría | 138 |
| Figura A2: Perfil de compuestos fenólicos foliares en el ecotipo <i>Ler-0</i> y la mutante <i>uvr8</i> obtenida en el mismo fondo genético en respuesta a UV-B. | 139 |
| Figura A3: Cromatogramas representativos de los ecotipos <i>Col-0</i> y <i>Ler-0</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de las mutantes <i>tt4-1</i> y <i>fah1-7</i> | 140 |

Interacciones entre el ambiente lumínico y la producción de defensas contra herbívoros y patógenos en plantas

La radiación UV-B es un componente importante de la luz solar y tiene efectos netos sobre el desarrollo de las plantas. En condiciones naturales se observa frecuentemente que las plantas expuestas a la radiación UV-B son menos atacadas por insectos herbívoros. Estudios previos indicaron que este fenómeno se encontraba relacionado a cambios en la calidad de los tejidos vegetales producido por la radiación UV-B. Se ha sugerido que podría existir una convergencia entre las cascadas de señalización inducidas por el UV-B y por la herbivoría ya que algunos de los compuestos inducidos por el UV-B también son producidos en respuesta al ataque de insectos. En base a esto, en el presente trabajo de tesis se estudió el rol de la vía de señalización de jasmonatos y el papel del fotorreceptor de UV-B, UVR8, sobre el incremento de la resistencia a insectos y patógenos necrótrofos producido por la exposición de las plantas a la radiación UV-B. A partir de los experimentos realizados con las plantas modelo *Nicotiana attenuata* y *Arabidopsis thaliana*, se evaluó la producción de diversos componentes de la respuesta de defensa y la resistencia de insectos y patógenos mediante bioensayos. Como resultado, se encontró que parte del efecto de la radiación UV-B incrementando las defensas implica a la vía de los jasmonatos y que la radiación UV-B incrementa la sensibilidad de los tejidos a estas hormonas. En otros casos, el UV-B incrementa la resistencia a agresores bióticos por mecanismos independientes de los jasmonatos, pero que son dependientes del fotorreceptor UVR8.

El trabajo presentado en esta tesis constituye la primera evidencia directa del rol de los jasmonatos en el incremento de las defensas producido por la radiación UV-B y es además el primer trabajo donde se evalúa el rol del fotorreceptor UVR8 sobre la producción de defensas

Palabras clave: Radiación UV-B, jasmonatos, UVR8, herbivoría, defensas inducibles, interacciones bióticas

Interactions between light environment and the production of defenses against herbivores and pathogens in plants

UV-B radiation is an important component of sunlight and has net effects on plant development. In natural conditions is frequently observed that plants exposed to UV-B radiation are less attacked by herbivorous insects. Previous studies indicated that this phenomenon was related to changes in the quality of plant tissues produced by the UV-B itself. It has been suggested that there could be a convergence of signaling cascades induced by UV-B and herbivory since some of the compounds induced by UV-B are also produced in response to insect attack. On this basis, the present thesis studied the role of jasmonates signaling pathway and the role of UV-B photoreceptor, UVR8, on increasing the resistance to necrotrophic pathogens and insects produced by exposure of plants to UV-B radiation. Field and greenhouse experiments were performed with the model plants *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana attenuata*, evaluating the production of various components of the defense response and the resistance to insects and pathogens by bioassays. As a result, it was found that part of the effect of UV-B radiation increasing defenses involves the jasmonate pathway, mainly because UV-B radiation increases the sensitivity of tissues to these hormones. In other cases, the UV-B radiation increases the resistance to biotic aggressors by mechanisms independent of jasmonates but dependent on UVR8 photoreceptor.

The work presented in this thesis is the first direct evidence of the role of jasmonates in the increased resistance produced by UV-B radiation, and is also the first study evaluating the role of the UVR8 photoreceptor on defense production.

Keywords: UV-B radiation, jasmonates, UVR8, herbivory, inducible defenses, biotic interactions

Capítulo 1

Introducción general, objetivos e hipótesis

Una de las frases más utilizadas cuando se habla de plantas en diversos ámbitos del conocimiento es **“las plantas son organismos sésiles”**. Esta frase, si bien parece obvia, representa un concepto sumamente importante, ya que sitúa a los miembros del reino vegetal en un marco conceptual completamente distinto al de aquellos organismos que pueden utilizar la locomoción como medio de satisfacer necesidades básicas como nutrición, reproducción y defensa.

Un organismo con capacidad de locomoción puede desplazarse a un nuevo ambiente si las condiciones del entorno son desfavorables, o moverse en busca de nuevas fuentes de alimento si aquellas de las que dispone no son suficientes para sustentarse. Sin embargo, en el caso de las plantas, al estar restringidas al ambiente donde se encuentran, se ven obligadas diariamente a la “toma de decisiones estratégicas”. Esta “toma de decisiones” comprende en realidad un reajuste constante del balance de recursos obtenidos y la asignación de los mismos al cumplimiento de funciones diversas. Para realizar este ajuste plástico con mayor eficiencia, las plantas han ido evolucionando a lo largo del tiempo, adquiriendo la capacidad de integrar el conjunto de señales percibidas del medio ambiente, y en consecuencia desencadenar un repertorio de respuestas cuyo balance es crucial para determinar el éxito de los individuos en el ambiente donde se desarrollan (Figura 1).

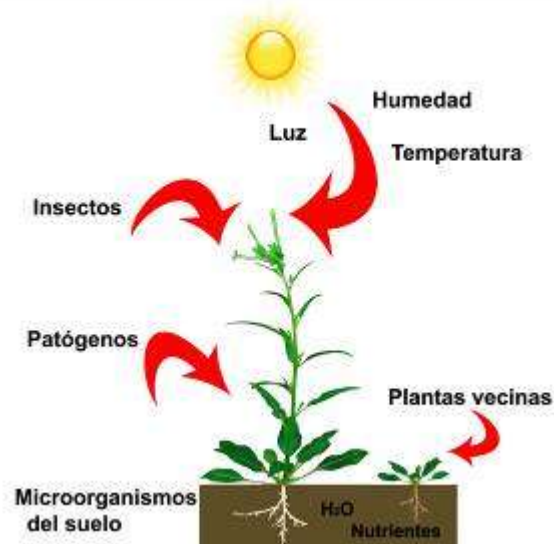


Figura 1: Señales del ambiente percibidas e integradas por las plantas.

Es por ello que las plantas poseen un acervo de receptores destinados a percibir diversos estímulos. Si bien estos receptores se encuentran especializados en la percepción de señales diversas, las respuestas que desencadenan en muchas ocasiones

utilizan vías de señalización integradas, de manera tal de producir una asignación de recursos eficiente en respuesta a la información del medio ambiente.

1- La luz

Entre las señales medioambientales más relevantes percibidas por las plantas se encuentran aquellas que involucran a la luz. La luz es un factor sumamente importante para el desarrollo, ya que por ser organismos fotoautótrofos, las plantas dependen de la luz ambiental como fuente primaria de energía. No todas las porciones del espectro solar pueden ser utilizadas para este fin; sin embargo, algunas franjas del espectro proveen información sobre las condiciones del ambiente circundante. Es por ello que las plantas disponen de un conjunto variado de fotorreceptores destinados a percibir la calidad y cantidad de luz disponible en el entorno.

La luz como fuente de energía e información

La luz percibida por las plantas en su ambiente natural está constituida por un conjunto de radiaciones de energía variable provenientes del sol (Figura 2). Una fracción de esa radiación, en el rango correspondiente a la luz visible (400-700nm), es utilizada por las plantas como fuente de energía para la reducción del CO_2 y la generación de hidratos de carbono durante el proceso de **fotosíntesis**. Además del conjunto de radiaciones fotosintéticamente activas, el sol emite radiaciones por fuera del rango visible en la región ultravioleta (UV, 200-400nm) e infrarroja (mayores a 700nm) del espectro.

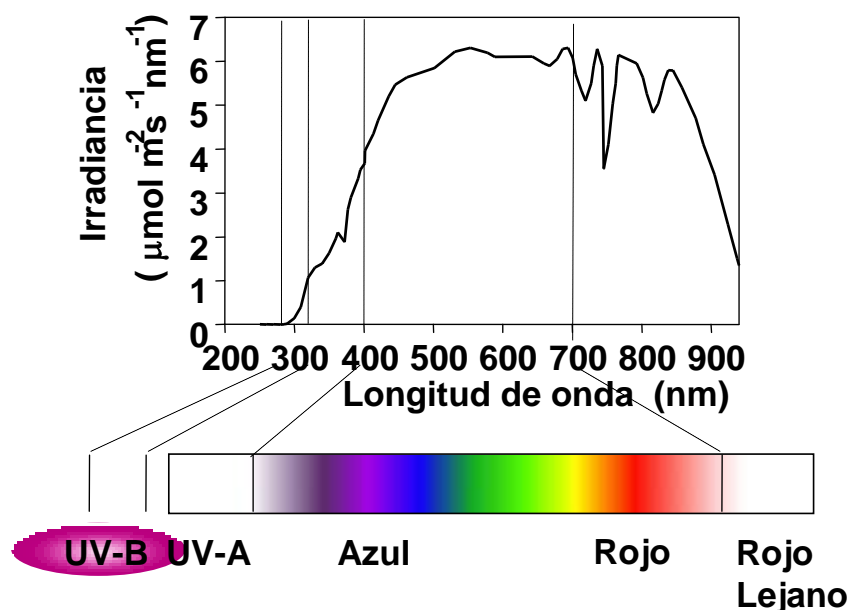


Figura 2: Distribución espectral de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre. A medida que la luz pasa a través de la atmósfera parte de la radiación incidente es absorbida por los gases presentes (O_3 , O_2 , CO_2 , N_2 , H_2O , entre otros), que absorben en rangos de longitudes de ondas específicos. Parte de la radiación es también redistribuida por efectos de dispersión causados por las mismas moléculas gaseosas presentes en la atmósfera (dispersión de Rayleigh). La radiación UV-B constituye un 3% de la radiación solar total incidente.

Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta fue descubierta a comienzos del siglo XVII al observarse que la exposición de cristales de nitrato de plata a la luz solar producía la oxidación de los mismos. A causa de su capacidad para inducir reacciones fueron denominados en principio “rayos químicos”. Esta denominación se conservó hasta mediados del siglo XIX, cuando se los empezó a llamar rayos ultravioletas, porque su efectividad para inducir reacciones de oxidación es mayor aún que la de la luz violeta visible (Hockberger, 2002).

En la actualidad, se sabe que la franja del ultravioleta, comprende radiaciones de menor longitud de onda y mayor energía que la franja de la luz visible, divididas convencionalmente en tres clases de acuerdo al rango de longitudes de onda (Figura 3): UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm) (www.iso.org).

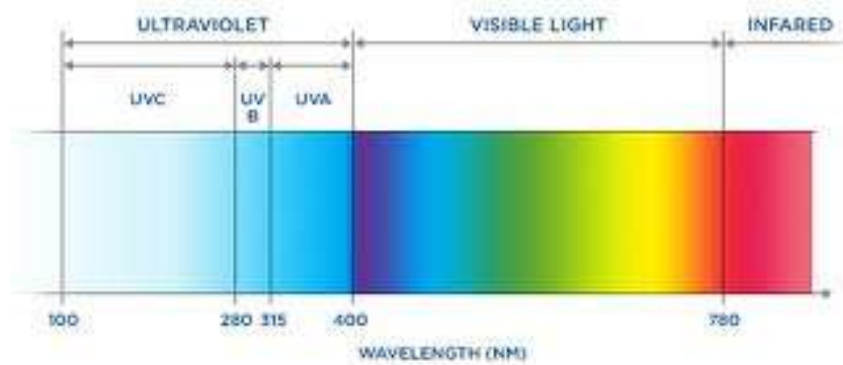


Figura 3: Clasificación de la radiación UV en función de la longitud de onda (www.iso.org)

La radiación UV-C es altamente energética y puede producir daños irreversibles en el ADN y otras macromoléculas dada su capacidad de inducir la formación de radicales libres que desencadenan procesos de estrés oxidativo y muerte celular programada (Gao et al., 2008). Sin embargo, la radiación UV-C no llega a la superficie terrestre debido a que es atenuada por absorción de la capa de ozono, el oxígeno atmosférico y por procesos de dispersión (*Rayleigh scattering*). La franja del UV-B

también es parcialmente bloqueada por el ozono estratosférico, mientras que el UV-A sufre menor atenuación por la atmósfera. Tanto el UV-B como el UV-A pueden interactuar con una variedad de macromoléculas generando diversos efectos biológicos (Caldwell et al., 2007). La radiación UV-B, en particular, ha sido foco de atención en los últimos 30 años debido a la influencia que tiene sobre los ecosistemas terrestres.

La radiación UV-B: efectos sobre las plantas

Respecto a los efectos de la radiación UV-B ambiental sobre las plantas, se han realizado numerosos trabajos a nivel ecológico, fisiológico y molecular. Los primeros estudios tuvieron como interés principal estimar los efectos deletéreos que podrían tener aumentos en la radiación UV-B resultantes de la disminución en la capa de ozono (Caldwell et al., 2003). A nivel morfológico, trabajos como los de Ballaré et al.(1996) ; Krizek et al.(1998), demostraron que la exposición al UV-B ambiental tiene un leve impacto negativo sobre el crecimiento de plantas terrestres en latitudes medias, principalmente sobre el área foliar (Searles et al., 2001) , mientras que en condiciones de suplementación artificial con UV-B se han observado disminuciones en el área foliar y en el número de células de la epidermis (Zhao et al., 2003; Wargent et al., 2009). Estos efectos negativos están acompañados de incrementos a nivel de daño del ADN y otras biomoléculas (Mazza et al., 1999). Otros trabajos han documentado, además, incrementos en los niveles de compuestos oxidantes, especies reactivas del oxígeno (ROS) y enzimas involucradas en la protección contra el estrés oxidativo (Rao et al., 1996; Dai et al., 1997; Mazza et al., 1999, Casati y Walbot, 2004), incrementos en el contenido de compuestos fotoprotectores, como los flavonoides y otros compuestos fenólicos (Cuadra et al., 1997; Mazza et al., 1999; Tegelberg et al., 2001; Ibañez et al., 2008; González et al., 2009), y cambios cualitativos y cuantitativos en otros metabolitos secundarios, como las ceras (Gordon et al., 1998; Fukuda et al., 2008), terpenoides (Maffei y Scannerini, 2000; Dinh et al., 2012) y oxilipinas (A.-H.-Mackerness et al., 1999). La producción de compuestos fenólicos es quizá una de las respuestas más características frente a la exposición a la radiación UV-B, produciéndose en un rango variado de longitudes de onda e intensidad de exposición. Estos compuestos no sólo cumplen un rol fotoprotector atenuando parte de la radiación UV incidente, sino que también se ha propuesto que podrían participar en la respuesta a otros factores, como en la atenuación del estrés oxidativo y la defensa contra el ataque de patógenos e insectos herbívoros (Simmonds, 2003; Treutter, 2006)

Percepción de la radiación UV-B

Existen numerosos estudios sobre el rol de los fotorreceptores involucrados en la percepción de las franjas del azul, rojo y rojo lejano. Sin embargo hasta hace pocos años, el conocimiento sobre los receptores involucrados en la percepción de la radiación UV era más limitado, y si bien se había caracterizado a los fotorreceptores capaces de percibir el UV-A (criptocromos y fototropinas), a comienzos de esta tesis se desconocía la existencia de fotorreceptores específicos de la radiación UV-B en plantas.

Durante mucho tiempo ha estado en discusión si las plantas poseían fotorreceptores de UV-B propiamente dichos. Dado que la luz UV-B es una radiación de alta energía se ha postulado que la percepción por las plantas podría resultar del daño directo sobre biomoléculas, (ya que la misma radiación es capaz de producir procesos fotoquímicos en componentes celulares), o bien por el estrés oxidativo generado como consecuencia del daño celular. Existen por ejemplo numerosos trabajos que demuestran que la exposición a UV-B induce la formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina (DCPs) en el ADN, comprometiendo la integridad del material genético y provocando la interrupción de varios procesos celulares (Britt, 2004; Giordano et al., 2004; Takahashi et al., 2011). Dado que algunos estudios demuestran correlación entre los niveles de DCPs y la inducción de algunas respuestas al UV-B (Kucera et al., 2003; Giordano et al., 2004), el daño directo al ADN podría ser uno de los eventos iniciales involucrados en la percepción del UV. Sin embargo, trabajos como los de Kim et al. (1998) y Boccalandro et al. (2001) han demostrado que respuestas fotomorfogénicas promovidas por el UV-B tales como la apertura de cotiledones y la inhibición del alargamiento del hipocotilo no están relacionadas con el daño acumulado en el ADN de las plantas expuestas, sugiriendo la existencia de otra molécula fotorreceptora.

En los últimos 6 años, se han realizado enormes avances en la comprensión de los mecanismos que utilizan las plantas para responder a la radiación UV-B gracias a la identificación en *A. thaliana* del locus *UVR8* (del inglés *UV-resistance locus 8*). El locus *UVR8* comprende un gen que codifica para una proteína con homología a un regulador de la condensación de la cromatina en humanos (RCC1, (Kliebenstein et al., 2002b)), y que originalmente se había propuesto como un elemento importante en la cadena de transducción de señales que involucraban a las respuestas al UV-B. En el transcurso del año 2011, se han presentado evidencias concluyentes de que la proteína

UVR8 es el receptor de la luz UV-B (Rizzini et al., 2011) y se han encontrado homólogos en otras especies vegetales como *Zea mays* (Jenkins, 2009).

Actualmente se sabe que el receptor UVR8 controla la expresión de muchos de los genes involucrados en respuestas de aclimatación y protección contra la radiación UV-B (Jenkins, 2009). Los genes que se encuentran regulados por UVR8 incluyen a los genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenólicos como los flavonoides, genes que codifican para enzimas fotoliasas (enzimas encargadas de reparar el daño producido por el UV-B en el ADN vegetal) y genes relacionados con las respuestas de protección frente al estrés oxidativo y el daño por la producción de radicales libres (Brown et al., 2005; Favory et al., 2009).

2- Los factores bióticos

Las respuestas a herbivoría en plantas

Independientemente del ambiente en el cual se desarrollan, las plantas se encuentran constantemente expuestas al ataque de herbívoros, entre los cuales se encuentran varias especies de mamíferos, pero principalmente de insectos. Las plantas constituyen una fuente de alimento sumamente importante para insectos de diversos grupos taxonómicos y gremios de consumo. Se estima que más de un millón de especies de insectos son herbívoros, por lo que la herbivoría natural se encuentra entre los principales factores que afectan la productividad de cultivos y la supervivencia de plantas en ecosistemas naturales (Futuyma y Agrawal, 2009).

Dado que las plantas son organismos sésiles, han desarrollado un enorme conjunto de defensas físicas y químicas que generan resistencia al ataque de los insectos. Algunas de estas defensas implican caracteres morfológicos particulares, como la presencia de tricomas, espinas, producción de hojas duras, etc. Además, las plantas son capaces de producir proteínas de defensa (ej: inhibidores de proteasas de insectos) y metabolitos secundarios (compuestos cianogénicos, alcaloides, fenólicos y glucosinolatos) que tienen efectos negativos sobre el desarrollo de los insectos y en algunos casos son directamente letales (Figura 4).



Figura 4: Ejemplo de algunas defensas estructurales y compuestos secundarios más comunes en plantas

Si bien algunos de estos mecanismos de defensa operan a nivel constitutivo, otros forman parte de una vía general de defensas inducibles en la que el ácido jasmónico (JA) es la hormona que juega el rol central.

Los mecanismos de respuesta que involucran al JA se inician como consecuencia del ataque. La destrucción del tejido foliar producida por los insectos sumada a componentes de las secreciones orales de los mismos dan inicio a cascadas de transducción de señales que conducen a incrementos dramáticos en los niveles de JA y otros derivados bioactivos. Los derivados bioactivos del JA, median cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos de defensa y relocalización de recursos (Howe y Jander, 2008).

Si bien existen variaciones entre las distintas especies en cuanto a la diversidad de genes y enzimas implicados, el mecanismo general de síntesis de JA se encuentra ampliamente conservado. La síntesis de JA comienza en el cloroplasto, a partir de ácido linolénico (α -LeA) originado de lípidos de la membrana plastídica (Figura 5).

Síntesis de JA en respuesta a daño mecánico y herbivoría

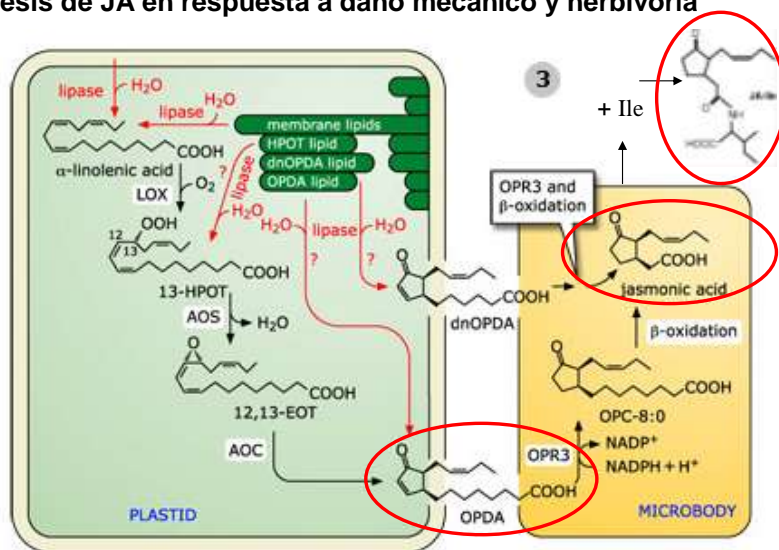


Figura 5: Esquema de la vía de síntesis de JA y otras oxilipinas derivadas. Adaptado de http://www.ruhr-uni-bochum.de/pflaphy/Seiten_en/PG_Kubigsteltig_e.html

El ácido linolénico es transformado dentro del cloroplasto en ácido oxo-fitodienoico (OPDA) a través de reacciones enzimáticas que involucran lipoxigenasas y reductasas. Las 13-lipoxigenasas juegan un rol importante en los pasos iniciales de la síntesis de JAs. En *Nicotiana attenuata*, se conocen hasta el momento tres genes que codifican para 13-lipoxigenasas. De los tres genes identificados, la LIPOXGENASA3 (LOX3) es la principal responsable de la acumulación de JA en respuesta a herbivoría; líneas transgénicas silenciadas para la expresión de esta enzima son más sensibles a la herbivoría y carecen de JA en niveles detectables (Halitschke y Baldwin, 2003). En *A. thaliana* existen 6 genes con secuencia de lipoxigenasa, que difieren en cuanto al tejido en el que se expresan y las respuestas en las cuales están involucradas. La LIPOXIGENASA2, codificada por el gen *LOX2*, está involucrada en la síntesis de la mayor parte de los JAs producidos en tejido foliar en respuesta a daño (Acosta y Farmer, 2010).

El OPDA sintetizado en los cloroplastos es transportado a los peroxisomas, donde es transformado en JA a través de reacciones de oxidación. Una vez finalizada la síntesis en los peroxisomas, el JA es exportado al citosol donde puede ser modificado y conjugado con otras moléculas, siendo su éster conjugado con isoleucina (JA-Ile) el de mayor actividad biológica. En *A. thaliana*, los niveles de Ja-Ile se incrementan a los 5 minutos del daño desde 5 pmol a 100pmol/gr de tejido fresco y alcanzan valores máximos de hasta de 1000 pmol/gr de tejido fresco entre los 30 y 60 minutos. (Browse,

2009); esta cinética de inducción es similar a la observada en otras especies. La enzima involucrada en la síntesis del conjugado de JA-Ile se encuentra en el citosol y en *A. thaliana* es codificada por el locus *JARI* (Staswick y Tiriyaki, 2004).

Los JAs también están involucrados en la respuesta contra hongos necrótrofos

La vía del JA no solo es esencial en la respuesta a insectos herbívoros masticadores sino también en la defensa contra hongos patógenos necrótrofos.

Los hongos fitopatógenos pueden agruparse en cuanto a los mecanismos de infección utilizados en **biótrosos**, **necrótrofos** y **hemibiótrosos** (Glazebrook, 2005). Mientras que los hongos biótrosos invaden y proliferan sobre tejidos vegetales vivos utilizando mecanismos que les permiten absorber nutrientes sin causar ruptura celular, los necrótrofos obtienen sus nutrientes del contenido de células a las que han dañado previamente de forma irreversible, causando necrosis de los tejidos vegetales.

En el caso de los hongos biótrosos, la estrategia de defensa de las plantas consiste en la organización de una respuesta hipersensible (RH) que incluye el disparo de un proceso de muerte celular programada. La RH, causa entre otros eventos una necrosis controlada en las células invadidas y las células circundantes, restringiendo el avance del hongo, lo que constituye un mecanismo de defensa efectivo (Dixon et al., 1994; Laluk y Mengiste, 2010). La RH es un mecanismo altamente regulado que se encuentra mediado principalmente por el ácido salicílico (SA).

En cambio, la RH no es un mecanismo de defensa efectivo contra los hongos necrótrofos, que incluso pueden llegar a beneficiarse de ella (Govrin y Levine, 2000;). En lugar de ello, la planta produce compuestos de defensa como las fitoalexinas, alcaloides y otros metabolitos y proteínas de defensa que resultan directamente tóxicas para el hongo o le impiden el movimiento y la proliferación dentro del tejido foliar (Laluk y Mengiste, 2010). Las respuestas de defensa contra hongos necrótrofos están mayormente reguladas por la acción conjunta de la vía de señalización del JA y del etileno (ET) (Berrocal-Lobo et al., 2002) y las líneas mutantes y transgénicas deficientes en componentes involucrados en la síntesis o señalización de estas hormonas son más sensibles al ataque de estos hongos .

4- Las interacciones

Convergencia de respuestas a UV-B y la defensa

Además de los efectos anteriormente mencionados sobre el crecimiento y el metabolismo de las plantas, una serie de estudios han demostrado que las plantas expuestas a la radiación UV-B ambiental son frecuentemente más resistentes a insectos, lo que se observa por una menor intensidad en la herbivoría (Rousseaux et al., 1998; Mazza et al., 1999); retrasos en el desarrollo de larvas (Zavala et al., 2001; Izaguirre et al., 2003) e incluso efectos sobre la selección del sitio de oviposición (Caputo et al., 2006; Foggo et al., 2007). Si bien estos efectos varían de acuerdo al sistema estudiado y en parte podrían deberse a una influencia directa del UV-B sobre los herbívoros mismos (Mazza et al., 1999; Mazza et al., 2002), resulta claro que el UV-B tiene efectos regulatorios sobre procesos involucrados en la producción de metabolitos secundarios que podrían tener efectos negativos sobre la herbivoría. En este aspecto existen estudios que reportan cambios en la expresión génica y en los niveles de varios metabolitos secundarios en respuesta al UV-B que guardan similitud con los producidos frente al ataque de insectos; sugiriendo una superposición o convergencia en las vías de respuesta al UV-B y a la herbivoría (Brosche et al., 2002; Izaguirre et al., 2006; Izaguirre et al., 2007).

Varios estudios han sugerido que la convergencia entre las vías de respuesta a UV-B y herbivoría se encuentran relacionadas al JA. Por ejemplo, ensayos realizados en nuestro laboratorio por Izaguirre *et al.* (2003) en solanáceas, reportaron aumentos en la expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de JA y otras oxilipinas en respuesta a la exposición a UV-B. Estudios realizados en *A. thaliana* a fin de evaluar la posible convergencia de las vías de respuesta a UV-B y herbivoría (A.-H.-Mackerness et al., 1999) reportaron que la exposición a UV-B por sí sola indujo la producción JA y la expresión de genes involucrados en la defensa. Sin embargo, en estos estudios, se utilizaron altas dosis de UV-B y las respuestas observadas podrían deberse al estrés oxidativo producido por la exposición a dosis de radiación no comparables a las observadas en ambientes naturales. Por otro lado, existen evidencias en solanáceas (Stratmann et al., 2000) que indicarían que el rol del UV-B sería más bien el de potenciar la producción de diversas defensas antiherbívoro relacionadas a la vía de señalización de JA. Esta potenciación podría deberse a un aumento en la sensibilidad al JA en los tejidos expuestos al UV-B, produciéndose una mayor expresión de los genes involucrados en la modulación de la respuesta al JA por mecanismos aún desconocidos.

Estudios previos sobre la convergencia de las respuestas a UV-B y herbivoría en el grupo de trabajo

Nuestro laboratorio cuenta con una amplia trayectoria en el estudio de los efectos biológicos producidos por variaciones en el ambiente lumínico. Respecto a los efectos relacionados a la radiación UV-B, son varios los estudios que se han llevado a cabo para evaluar cambios en la morfología, desarrollo, resistencia a herbivoría, cambios en expresión génica y producción de proteínas y metabolitos secundarios de defensa (por ejemplo Mazza et al. (1999; 2000); Zavala et al.(2001), Giordano et al.(2003; 2004); Izaguirre et al.(2003; 2007); Rousseaux et al.(2004); Caputo et al.(2006)).

Trabajos previos realizados por el grupo relacionados con el efecto del UV-B solar sobre las defensas antiherbívoro, permitieron documentar:

- **Aumentos en la producción de compuestos fenólicos por exposición a UV-B en plantas de *Nicotiana attenuata* y *Nicotiana longiflora*.** Algunos de estos compuestos (por ejemplo el ácido clorogénico), también fueron inducidos al ser sometidas las plantas a herbivoría simulada (Izaguirre et al., 2007); mientras que otros como la rutina (un flavonoide) solo fueron inducidos en respuesta al tratamiento lumínico. Estudios anteriores de otros grupos han mostrado que la síntesis de algunos de esos compuestos es inducida por tratamiento de estas plantas con derivados de JA (Keinänen et al., 2001). Sin embargo, la conexión funcional entre los diversos disparadores, (es decir, si la inducción de estos compuestos por exposición a UV-B está mediada por el JA de la misma manera que la inducción por herbivoría), no ha sido aún esclarecida.

- **Preferencias en la selección del sitio de oviposición por las hembras de *Plutella xylostella* sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a distintos ambientes lumínicos;** se observó mayor oviposición en plantas que no habían sido expuestas al UV-B solar. Estos resultados se correlacionaron con menores niveles de fenólicos totales en las plantas no expuestas al UV-B; mientras que no se observaron preferencias ni diferencias en la producción de fenólicos al realizar los mismos experimentos con mutantes afectadas en la percepción del JA (*jar-1*) (Caputo et al., 2006). Otros autores han sugerido que este fenómeno estaría correlacionado no con cambios en el acervo de compuestos fenólicos sino con cambios en el nivel de glucosinolatos inducidos por la exposición de las plantas al UV-B solar (Foggo et al., 2007).

De los resultados de estos estudios resulta claro que el UV-B afecta la forma en la que las plantas responden a la herbivoría produciendo cambios en los tejidos que afectan negativamente a los herbívoros, lo cual genera una serie de preguntas:

- ¿Además del efecto inductor sobre la producción de metabolitos secundarios fotoprotectores, induce el UV-B la producción de otros metabolitos secundarios (fenólicos, glucosinolatos, inhibidores de proteasas) con potenciales roles de defensa contra herbívoros?

- ¿El efecto inductor del UV-B, depende de la activación del mismo mecanismo de señalización que el que activa la herbivoría (Ej, vía del JA u otras oxilipinas)?

- ¿En condiciones de radiación natural, activa el UV-B la producción de defensas o únicamente potencia las respuestas inducidas por los herbívoros?

- ¿Se trata de la convergencia de dos mecanismos de percepción distintos que activan una respuesta en común?

Teniendo en cuenta el mecanismo general de inducción de la vía del JA (Figura 6), podría pensarse que el UV-B influye en alguno de los distintos niveles de la respuesta de defensa, entre ellos:

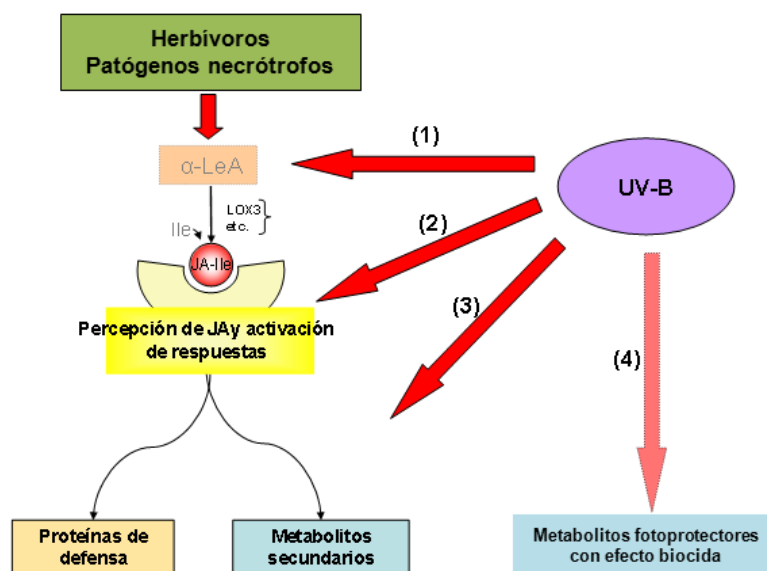


Figura 6: Mecanismo general de respuesta al ataque de herbívoros o patógenos necrótrofos y las etapas donde la radiación UV-B podría estar afectando la respuesta de defensa. Modificado de Demkura et al. (2010).

(1) una inducción directa en la producción de JA o bien la modulación de eventos que ocurren río arriba de su síntesis (ej: activación de cascadas de fosforilación, elementos reguladores, etc);

(2) la modulación de elementos involucrados en la respuesta al JA (por ej. cambios en la expresión y/o regulación de factores de transcripción inducidos por el JA que regulan la expresión de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios);

(3) la existencia de puntos de convergencia en las vías de transducción de señales que conducen a la producción de los mismos metabolitos de defensa que los inducidos por la vía del JA o bien

(4), algún efecto negativo de los compuestos fotoprotectores independiente de las respuestas mediadas por JA.

Cabe destacar, como se mencionó anteriormente, que si bien el efecto del UV-B sobre la síntesis de JA ya ha sido postulado (Conconi et al., 1996; A.-H.-Mackerness et al., 1999) el uso de dosis de UV-B poco realistas en los ensayos realizados en los trabajos citados podría no reflejar satisfactoriamente los cambios metabólicos que se producen en plantas expuestas a condiciones naturales de radiación, donde los efectos del UV-B sobre la herbivoría han sido claramente documentados. Tampoco está demostrado si las respuestas de herbivoría inducidas por el UV-B son independientes de las respuestas mediadas por la vía UVR8-COP1.

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es contribuir al conocimiento y a la comprensión de los mecanismos fisiológicos que determinan la influencia del ambiente lumínico sobre las interacciones bióticas, poniendo énfasis en los efectos de la radiación UV-B natural sobre los mecanismos de defensa contra insectos y patógenos mediados por el JA en plantas terrestres.

Objetivos específicos

- Determinar el rol de la radiación UV-B natural sobre la inducción y modulación de las respuestas de defensa reguladas por los jasmonatos.
- Evaluar los mecanismos mediante los cuales la percepción del UV-B se conecta con la inducción de defensas en respuesta al ataque de agresores bióticos.

Hipótesis

1) La radiación UV-B natural produce una inducción directa de la síntesis de jasmonatos bioactivos. En base a esta hipótesis esperaríamos que la exposición de plantas a dosis de UV-B representativas del ambiente natural produzcan incrementos en los niveles de JA, o de conjugados como el JA-Ile que han sido directamente involucrados en la cascada de señalización que dispara las respuestas de defensas inducibles.

2) Las plantas (o tejidos) expuestos al UV-B presentan mayor sensibilidad al JA respecto de aquellos que reciben niveles atenuados de UV-B. Sobre la base de esta hipótesis esperaríamos que tanto la expresión de genes reguladores y genes de defensa activados por herbivoría, ataque de patógenos necrótrofos o por aplicación exógena de JA, se vea incrementada en las plantas que han sido previamente expuestas al UV-B.

3) La inducción por exposición a UV-B de metabolitos de defensa como los fenólicos y glucosinolatos está mediada por JA. Esta hipótesis está relacionada a la convergencia entre las vías de respuesta a UV-B y la de respuesta a herbivoría. En este sentido se espera que líneas mutantes afectadas en la síntesis o percepción y señalización de JAs sean deficientes en la producción de estos metabolitos cuando son expuestas al UV-B y que esa deficiencia se correlacione con diferencias en el patrón de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de los mismos.

4) La inducción de respuestas antiherbívoro por efecto del UV-B solar involucra la vía de señalización de UVR8-COP1. De acuerdo a esta hipótesis esperamos que líneas mutantes deficientes en UVR8 se vean afectadas en la inducción por UV-B de las respuestas de defensa.

Capítulo 2

Efectos de la radiación UV-B sobre la producción de compuestos de defensa:

Rol de los jasmonatos en la producción de defensas inducibles por UV-B en *Nicotiana attenuata*

Los resultados de este capítulo se encuentran parcialmente publicados en:

Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballaré CL (2010) Jasmonate –dependent and independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**: 1084–1095.

Introducción

La radiación UV-B tiene numerosos efectos sobre el metabolismo secundario en plantas. Una de las consecuencias notables de los cambios producidos por el UV-B a nivel de metabolismo secundario es el impacto negativo que generalmente se observa sobre la herbivoría natural. Este fenómeno ha sido observado a menudo en experimentos realizados a campo en los cuales se manipularon las condiciones de exposición al UV-B solar (Ballaré et al., 2001; Caldwell et al., 2003; Bassman, 2004; Roberts y Paul, 2006; Ballaré, 2011; Kuhlmann y Müller, 2011). Parte de estos efectos parece ser una consecuencia directa de la percepción de la radiación UV-B por los insectos, tal como ha sido demostrado en los trabajos de Mazza et al. (2002; 2010) con especies de thrips de soja. Sin embargo, existen evidencias experimentales suficientes que sugieren que más allá de un efecto directo del UV-B sobre los herbívoros, ocurren cambios en la calidad de los tejidos de plantas expuestas (bien por la producción de compuestos tóxicos o por los cambios inducidos a nivel morfológico), que explican la menor tasa de herbivoría, ya que el efecto “antiherbivoro” ha sido observado aún en bioensayos con insectos no expuestos a la radiación (Rousseaux et al., 1998).

Estudios de tipo “choice” y “no-choice” con insectos herbívoros han demostrado que la exposición a la radiación UV-B puede producir cambios en la calidad de los tejidos que afectan factores claves para el desarrollo de los insectos, tales como el comportamiento de alimentación (Ballaré et al., 1996; Rousseaux et al., 1998) la selección de sitios de oviposición (Caputo et al., 2006) y el desarrollo y crecimiento larval (Zavala et al., 2001; Izaguirre et al., 2003; Kuhlmann y Müller, 2009). En todos estos casos, los efectos del UV-B sobre la resistencia de la planta a la herbivoría han sido correlacionados con variaciones en componentes que hacen a la calidad alimenticia de los tejidos vegetales, tales como el contenido de nitrógeno (Hatcher y Paul, 1994), los niveles de diversos compuestos fenólicos (McCloud y Berenbaum, 1994; Rousseaux et al., 2004; Izaguirre et al., 2007; Kuhlmann y Müller, 2009), compuestos cianogénicos (Lindroth et al., 2000), proteínas involucradas en la defensa, tales como los inhibidores de proteinasas insectiles (Stratmann et al., 2000; Izaguirre et al., 2003; Stratmann, 2003) y compuestos derivados de terpenos, como los glicósidos de terpenoides (DTGs, del inglés *diterpene glycosides*, (Đinh et al., 2012).

Una de las respuestas más características y mayormente conservadas en varias especies estudiadas y en una amplia gama de condiciones de exposición al UV-B es la

producción de compuestos fenólicos (Braun y Tevini, 1993; Landry et al., 1995; Reuber et al., 1996; Bilger et al., 1997; Barnes et al., 2000; Mazza et al., 2000). Algunos compuestos fenólicos solubles son también inducidos por la herbivoría, y si bien existen variaciones respecto del tipo de compuesto producido según la especie vegetal estudiada y el herbívoro utilizado, muchos de ellos son ubicuos y se encuentran ampliamente distribuidos. Existen evidencias de que estos compuestos juegan un rol en la defensa, debido a que son directamente tóxicos o reducen la disponibilidad de otros compuestos presentes en la hoja (Elliger et al., 1981; Stamp y Osier, 1998; Hoffland et al., 2000; Leitner et al., 2005; Izaguirre et al., 2006).

Nicotiana attenuata Torr. ex S. Watson es una especie de tabaco salvaje de la familia de las solanáceas (Figura 1).

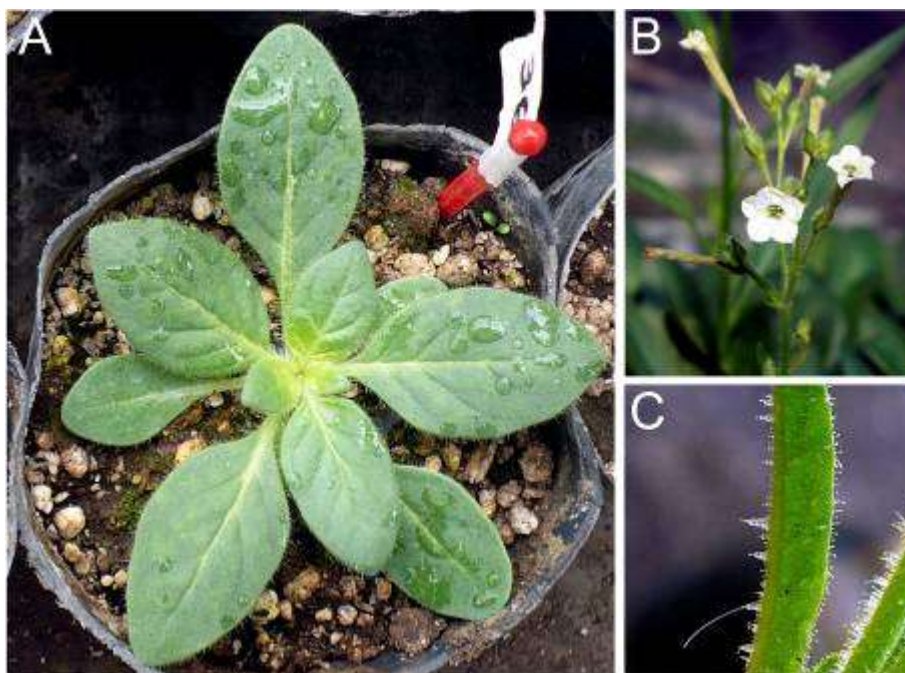


Figura 1: *Nicotiana attenuata*, plantas obtenidas a partir de semillas UT (Utah). **A)** Roseta de 2 semanas de edad. **B)** Flor. **C)** Vista con zoom óptico de los tricomas glandulares en la nervadura central (izquierda) y sobre el margen externo de la hoja (derecha).

Especie originaria del sur-suroeste de los Estados Unidos, ha sido ampliamente utilizada en estudios de interacciones planta-insecto tanto a nivel ecológico como molecular (Baldwin, 2001; Hermsmeier et al., 2001; Keinänen et al., 2001; Krügel et al., 2002). Entre las ventajas que presenta como modelo de estudio se encuentran el tamaño reducido de sus rosetas en comparación con el de otras especies del género (como *Nicotiana tabacum*), un ciclo de vida considerablemente corto, su capacidad de producir

una gran cantidad de semillas de generación en generación, la similitud de su genoma con el de *N. tabacum* (que se encuentra parcialmente secuenciado) y el hecho de que posee un conjunto de defensas químicas conocidas y caracterizadas. Entre los compuestos de defensa mayoritarios se encuentran alcaloides como la nicotina, compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y derivados conjugados a poliaminas (putrescina y espermidina), glicósidos de terpenoides y proteínas como los inhibidores de proteinasas insectiles (DTGs, y TPIs en inglés respectivamente).

Entre los insectos que comúnmente atacan a *N. attenuata* se encuentra *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae). El ataque de *M. sexta* en hojas de *N. attenuata* desencadena una serie de eventos que inducen la vía de las lipoxigenasas (lo que implica aumentos drásticos en los niveles endógenos de jasmonatos), y que culminan en la producción de metabolitos secundarios de defensa (Figura 2). La mayoría de estos eventos pueden emularse por la aplicación de tratamientos de herbivoría simulada o aplicación exógena de ácido jasmónico (Pluskota et al., 2007).

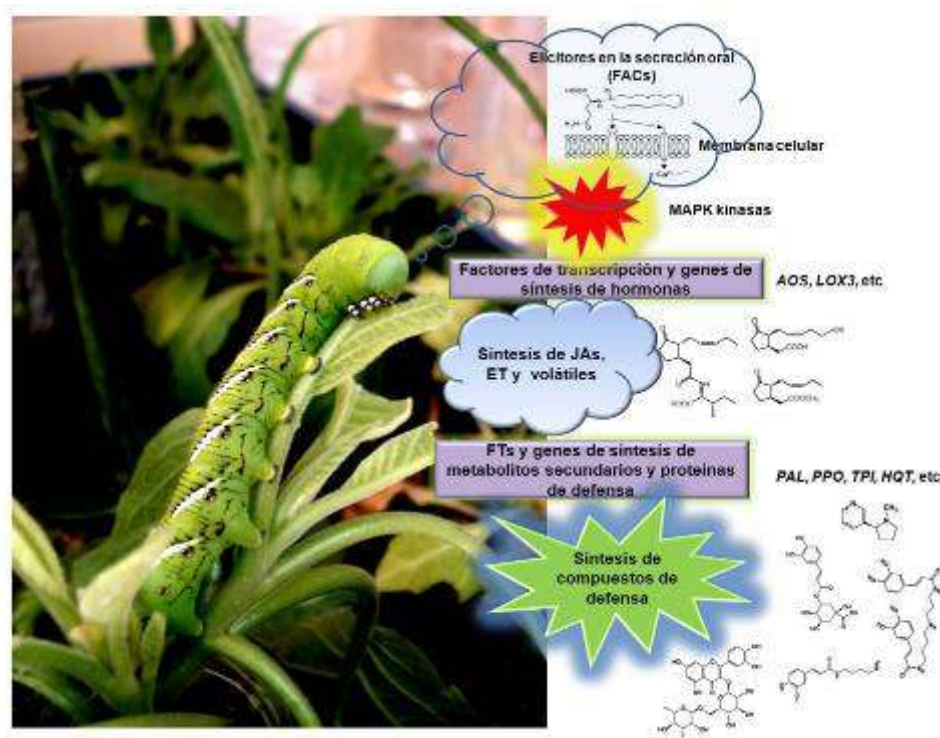


Figura 2: Esquema simplificado de la producción de defensas en *N. attenuata* luego del ataque de *M. sexta*. Modificado a partir de Wu et al., (2008). Compuestos presentes en la secreción oral de la oruga (FACs del inglés *fatty-acid conjugates*) son reconocidos por receptores de la célula vegetal, disparando una respuesta transducida por MAPK quinasas que induce la expresión de factores de transcripción y genes involucrados en la síntesis de JAs y ET, además de diversos compuestos volátiles. Los JAs, a su

vez inducen la expresión de factores de transcripción y genes involucrados en la síntesis de proteínas y compuestos de defensa.

Experiencias previas en nuestro laboratorio han mostrado que parte de las respuestas de defensa inducidas por la herbivoría en *N. attenuata* son emuladas o potenciadas por la exposición a tratamientos de UV-B. Experimentos conducidos por Izaguirre et al.(2007) encontraron que tanto el UV-B como la aplicación de tratamientos de herbivoría simulada producen incrementos en la producción de compuestos fenólicos de tipo C3-C6 (fenilpropanoides) como el ácido clorogénico y sus conjugados a poliaminas; mientras que compuestos de tipo C15 (flavonoides) solo fueron inducidos por tratamientos de exposición a UV-B. Esta superposición de respuestas ha sido observada también a nivel de transcriptoma en estudios donde se compararon los cambios en respuesta a daño o herbivoría simulada con los producidos por exposición a dosis de radiación UV-B (Izaguirre et al., 2003).

Estas observaciones, en conjunto, sugieren la idea de que los efectos del UV-B solar y la herbivoría en *N. attenuata* podrían:

a) estar mediados por las mismas cascadas de señalización, es decir, que las vías de señalización activadas por el UV-B serían las mismas que las activadas por la herbivoría. En este sentido sería de esperar que la exposición a dosis naturales de UV-B produzca en las plantas la inducción de la vía de las oxilipinas, incrementando los niveles de jasmonatos (JAs), tal como ha sido observado anteriormente en los experimentos de Conconi et al.(1996), si bien en estos experimentos se utilizaron dosis de UV de alta energía.

b) que la cascada de señalización activada por el UV-B conduzca a la producción de respuestas finales similares a las inducidas por el ataque de insectos herbívoros, tal como fue sugerido en los trabajos previos del grupo (Izaguirre et al., 2003; 2007). En este sentido se ha observado que la exposición a dosis naturales de UV-B induce en *N. attenuata* compuestos similares a los inducidos por la herbivoría, pero no se ha esclarecido aún si la inducción de esos compuestos está mediada por la misma vía de señalización (ej. si dependen de la vía de los JAs).

Es por ello que los objetivos a abordar en este capítulo son:

- Evaluar si los cambios inducidos por el UV-B sobre los niveles de metabolitos secundarios con efecto antiherbívoro dependen de la activación de la vía del ácido jasmónico.
- Evaluar si el UV-B induce defensas antiherbívoro *per se* o potencia las respuestas de herbivoría.
- Evaluar si niveles ecológicamente realistas de radiación UV-B influyen sobre los niveles de JAs bioactivos producidos por las plantas.

Materiales y métodos particulares de este capítulo

Material vegetal y condiciones de cultivo

Líneas utilizadas

Se utilizaron semillas obtenidas de una población salvaje provenientes de Utah, EEUU (genotipo salvaje, WT), las cuales fueron previamente autofecundadas durante 11 generaciones para tener un fondo genético uniforme (Halitschke y Baldwin, 2003), y una línea deficiente en la producción de JAs, *as-lox* (A300-1) por tener silenciada la expresión del gen que codifica para la enzima LIPOXIGENASA3 (LOX3). Ambas poblaciones de semillas fueron obtenidas del laboratorio de Ecología Molecular del Dr. Ian Baldwin del Instituto Max Planck de Ecología Química (Jena, Alemania).

Germinación de semillas de *N. attenuata*

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante tres lavados consecutivos con una solución de lavandina 5% v/v. Luego de la esterilización las semillas se lavaron con agua destilada para quitar los restos de hipoclorito de sodio. Para la inducción de la germinación se siguió el tratamiento recomendado por Krügel et al. (2002): Las semillas fueron incubadas en una solución de ácido giberélico 1 mM (GA₃, Sigma-Aldrich) y extracto de humo al 2% v/v (Geson Argentina) durante una hora. Luego de la incubación, las semillas se lavaron con agua destilada y se cultivaron en el invernáculo en bandejas plásticas con una mezcla de tierra: perlita (1:1) cubiertas con un film para mantener la humedad. Luego de la germinación las plántulas fueron transplantadas a las macetas de cultivo.

Cultivo de plantas

Luego de la germinación las plántulas se cultivaron en invernáculo en condiciones de día largo (desde agosto hasta marzo-abril) durante tres semanas en macetas individuales (0,25 L) con una mezcla de tierra: perlita (1:1). Las plantas fueron regadas cada dos días con una solución de Hakaphos Rojo (18-18-18,

Compo). Los niveles máximos de PAR recibidos durante el período de cultivo oscilaron entre los 800-1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para la realización de los experimentos se seleccionaron plantas de edad y tamaño similar (tres o cuatro semanas de edad y entre 7 y 10 hojas maduras). Las plantas seleccionadas fueron asignadas a los diversos tratamientos de forma aleatoria. Para los ensayos realizados en condiciones de campo, las plantas se cultivaron inicialmente dentro del invernáculo en macetas individuales (0,5 L), al cabo de tres semanas fueron trasladadas a las parcelas ubicadas en el campo experimental bajo media sombra, y luego de dos días de adaptación la media sombra fue retirada y las plantas asignadas a los tratamientos en forma aleatoria. Los ensayos en condiciones de campo fueron realizados entre el período de primavera y verano 2008-2009.

Tratamientos lumínicos

Manipulación de niveles de UV-B en los ensayos de invernáculo

La manipulación de los niveles de UV-B en los ensayos de invernáculo se llevó a cabo mediante la suplementación de la luz natural percibida dentro del invernáculo con lámparas fluorescentes (UV313; Q-Panel). Es importante notar que el componente de UV-B de la luz solar es filtrado por el vidrio y el techo plástico del invernáculo por lo que la suplementación con tubos fluorescentes no implica un tratamiento de sobre exposición a dosis naturales de UV-B sino una suplementación para simular niveles de UV-B similares a los naturales dentro del invernáculo. Las lámparas de UV-B se ubicaron en la parte superior de un dispositivo consistente en una estructura de caños de aluminio de 1 x 2 x 1,20 m, subdividida en dos mitades de 1 m² de superficie tal como se muestra en la Figura 3.



Figura 3: Arreglo de lámparas para los experimentos de suplementación con UV-B en el invernáculo.

Las dosis de radiación UV-B utilizadas en los experimentos fueron similares a las de estudios previos realizados por el grupo (Izaguirre et al., 2003) con niveles diarios de $5,5 \text{ kJ m}^{-2}$ (esta dosis fue calculada utilizando el espectro de acción normalizado a 300 nm según Caldwell (1971)). Esta dosis equivale a una irradiancia de $1,1 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (integrada entre los 290 y 315 nm). La exposición a la radiación UV-B no fue continua sino que se utilizaron períodos de exposición de 6 horas diarias centrados en el mediodía solar durante 11 días, siguiendo los protocolos establecidos en ensayos previos (Izaguirre et al., 2003; 2007). En los tratamientos sin UV-B (tratamiento Control), la exclusión de la luz UV-B de las lámparas se realizó cubriendo la mitad del dispositivo bajo las lámparas con filtros de poliéster de entre 100 y 150 μm (Mylar-D; Du Pont, Oeste Aislantes). El poliéster presenta la particularidad de absorber radiaciones de longitudes de onda menores a los 320 nm (Mazza et al., 2000), con lo cual las plantas colocadas en este sector del dispositivo no perciben la radiación UV-B de las lámparas. En el tratamiento de UV-B el filtro de poliéster fue remplazado por uno de diacetato de celulosa, que tiene la particularidad de absorber longitudes de onda por debajo de

los 280 nm. Esto se hizo para evitar la incidencia sobre las plantas de las trazas de radiación UV-C emitidas por las lámparas y asegurarse que en el tratamiento de UV las plantas sólo reciban radiación UV-B. Es importante aclarar que para evitar efectos debidos a diferencias en temperatura, circulación de aire, etc., las plantas fueron rotadas periódicamente dentro de cada tratamiento durante el transcurso de los experimentos para minimizar efectos posicionales.

Manipulación de los niveles de UV-B en condiciones naturales

En los ensayos realizados a campo, la atenuación del UV-B solar (tratamiento UV-B -) se realizó mediante el uso de filtros de poliéster (Mylar-D) utilizando un diseño similar al de los ensayos de invernáculo. Se colocaron en el campo experimental estructuras de caños de aluminio como las que se muestran en la Figura 4, de 1 x 2 m de superficie, donde el área asignada a cada tratamiento lumínico (área bajo los filtros en las que se ubicaron las plantas) fue de 1 m².



Figura 4: Dispositivos para los tratamientos lumínicos en condiciones naturales. **A)** Disposición de las parcelas en el campo experimental, con los arreglos divididos en dos mitades, una para cada tratamiento lumínico. **B)** Disposición de las plantas dentro de cada parcela.

En los tratamientos de exposición a UV-B natural (UV-B +), en lugar de diacetato de celulosa se utilizó un film transparente (Stretch Film) asegurando así

condiciones de humedad ambiente y temperaturas similares entre ambos tratamientos lumínicos.

Tratamientos de inducción de respuestas de herbivoría

Los tratamientos de inducción de respuestas de herbivoría detallados a continuación fueron aplicados posteriormente a los tratamientos lumínicos. Sin embargo, el tratamiento de UV-B se mantuvo hasta la cosecha del tejido.

Herbivoría simulada

Para los tratamientos de herbivoría simulada se seleccionaron las dos primeras hojas completamente expandidas de cada roseta. Las hojas fueron dañadas superficialmente en forma longitudinal a ambos lados de la nervadura central (seis heridas longitudinales por hoja, Figura 5). Las heridas fueron tratadas con 10 μ L de una dilución acuosa de secreciones orales de larvas de *Spodoptera frugiperda* (dilución 1:5 V/V).



Figura 5: Detalle de las lesiones realizadas en los tratamientos de daño simulado.

Este tratamiento induce en *N. attenuata* respuestas similares a las del ataque de otros insectos lepidópteros como *M. sexta* (ver Apéndice) y activa la cascada de señalización que involucra al JA. En el tratamiento sin herbivoría se seleccionaron y cosecharon hojas de posiciones nodales equivalentes en plantas independientes que no fueron dañadas.

Aplicación exógena de MeJA

El tratamiento con JA se realizó mediante la aplicación exógena de su éster metilado (MeJA) el cual se encuentra disponible comercialmente (Sigma-Aldrich). La aplicación se realizó mediante el rociado completo de las rosetas (aproximadamente 1 mL por planta) con soluciones de concentración 50 y 450 μM respectivamente. Para facilitar la disolución del MeJA las soluciones fueron preparadas con etanol absoluto en una concentración de 4% en agua MilliQ. Las plantas control se rociaron con 1 mL de una solución acuosa de etanol absoluto 4%. El tejido de las plantas se cosechó a las 24 hs de la aplicación del tratamiento de MeJA

Bioensayos

Evaluación del efecto de la radiación UV-B sobre la herbivoría natural en condiciones de campo

Los bioensayos en condiciones de campo fueron llevados a cabo en período de verano (enero-marzo de 2009) en el campo experimental del IFEVA. El diseño experimental consistió en un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas (bloques). Dentro de cada bloque se realizó la combinación de dos factores (tratamiento lumínico y genotipo). Los tratamientos lumínicos fueron: radiación UV-B atenuada (UV-B-, aproximadamente $0 \text{ kJ m}^{-2} \text{ UV-B}_{\text{BE}}$), y radiación UV-B natural (UV-B+ aproximadamente $8 \text{ kJ m}^{-2} \text{ UV-B}_{\text{BE}}$). Dentro de cada tratamiento lumínico se asignaron al azar plantas WT y *as-lox*. Ambos factores se encontraban representados en cada bloque, distribuyéndose cada factor al azar dentro del bloque (Ej. orientación Este-Oeste del tratamiento lumínico y ubicación al azar de cada genotipo en el tratamiento lumínico). Dentro de cada tratamiento lumínico se asignaron al azar tres plantas de cada genotipo, las cuales fueron cultivadas en las condiciones descriptas anteriormente. Las plantas fueron evaluadas al cabo de 4 días de transferidas a las parcelas de campo y cada dos días en adelante para evaluar la presencia de herbívoros y signos de herbivoría. Una vez que las plantas finalizaron la etapa vegetativa y comenzaron la floración fueron retiradas de las parcelas, y se cosechó el total de hojas de cada roseta. Las imágenes de las hojas fueron digitalizadas mediante el uso de un scanner (HP Scanjet 4500c, Hewlett-Packard) y el área total de cada hoja y el área dañada por la herbivoría fueron cuantificadas

mediante el uso de un software de procesamiento de imágenes (Adobe Photoshop Software, versión 7.0; Adobe Systems).

Análisis de metabolitos

Cuantificación de jasmonatos

Para determinar los niveles de JAs, se cosecharon hojas de experimentos realizados en invernáculo luego de 1 y 2 horas de aplicarse un tratamiento de herbivoría simulada, debido a que la inducción de JAs ocurre en *N. attenuata* en las primeras horas posteriores al tratamiento de herbivoría. En cada uno de los puntos temporales se cosecharon únicamente hojas dañadas (hojas intactas de posiciones nodales equivalentes en los tratamientos control), utilizándose plantas distintas en los distintos puntos temporales. Las hojas cosechadas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizadas. Para la cuantificación, se utilizaron alrededor de 250 mg de tejido liofilizado por muestra. El material vegetal fue homogeneizado con 10 mL de metanol al que se agregaron 50 ng de [$^2\text{H}_6$] JA, 50 ng de [$^2\text{H}_5$] OPDA, y 50 ng de [$^2\text{H}_3$] JA-Ile como estándares internos. Los extractos metanólicos fueron previamente purificados por cromatografía líquida (Andrade et al., 2005).

La separación de JA, OPDA y JA-Ile en los extractos se llevó a cabo por HPLC (Alliance 2695, Waters Corporation) utilizando una columna C18 (100 mm x 2,1 mm, 3 μm , Restek) con solventes A (ácido acético glacial 0,2% v/v en H_2O MilliQ) y B (metanol) y un gradiente lineal de 40% B a 0 min; 80% B a 25 min y hasta 26 min y 40% B desde 27 a 37 min de corrida. El flujo de solvente fue mantenido constante a 0,2 mL min $^{-1}$. La identificación de los compuestos de interés fue realizada mediante un análisis de espectrometría de masas (MS), llevado a cabo en un espectrómetro de masas de cuadrupolos en tandem (Quattro Ultima, Micromass), equipado con una fuente de ionización de tipo electrospray (ESI). Los espectros fueron registrados en modo negativo y analizados mediante el software MassLynx versión 4.1 (Micromass). El análisis de los compuestos de interés fue llevado a cabo mediante múltiples reacciones monitoreando los pares de iones deuterados y endógenos para el JA, OPDA y JA-Ile y la identificación se llevó a cabo en base a las siguientes transiciones: [$^2\text{H}_6$]JA, 215 > 59; JA, 209 > 59;

[²H₅]OPDA, 298 > 230; OPDA, 293 > 225; [²H₃]JA-Ile, 326 > 131; JA-Ile, 323 > 128, con tiempos de retención de 15, 18, y 22 min. para el JA, OPDA, y JA-Ile, respectivamente. Las condiciones óptimas para las reacciones de ionización fueron las siguientes: energía de la fuente de ionización, 5 eV (para todos los compuestos); voltaje del cono, 35 V, voltaje del ESI, 3,25 kV; temperatura de desolvatación, 350°C, y temperatura de la fuente, 120°C. La respuesta fue calculada como el producto del área del pico correspondiente al ión de interés x (concentración del estándar interno/área de pico del ión correspondiente al estándar interno).

Cuantificación de compuestos fenólicos foliares totales

Para la determinación de compuestos fenólicos, se cosecharon las dos primeras hojas completamente expandidas de cada roseta luego de 72 hs de aplicado el tratamiento de herbivoría simulada (en el caso de los tratamientos de herbivoría las dos hojas cosechadas habían sido previamente tratadas con el tratamiento de herbivoría simulada, mientras que para el tratamiento control se cosecharon hojas de posiciones nodales equivalentes). Para la cuantificación de fenólicos totales, se extrajeron de esas hojas discos de 1 cm de diámetro. Cada disco se colocó en 1,4 mL de una solución de metanol-HCl (99:1 v/v). Los extractos fueron incubados por 48 hs a -20°C (Mazza et al., 2000) y al cabo de ese período los fenólicos totales fueron cuantificados de forma relativa por espectrofotometría UV/Vis (UV-1700 series; Shimadzu) en base a la absorbancia de los extractos a 305 y 320 nm respectivamente. El tejido remanente de las hojas de las cuales se extrajeron los discos, fue cosechado y liofilizado para la determinación de compuestos fenólicos particulares por HPLC.

Determinación de compuestos fenólicos solubles por HPLC

Los compuestos fenólicos individuales fueron determinados por HPLC en base al método descrito por Keinänen et al., (2001) con algunas modificaciones. Entre 10 y 15 mg de tejido liofilizado por muestra (excluyendo la nervadura central) fueron homogeneizados en mortero y resuspendidos en 1,5 mL de una solución de metanol-ácido acético 0,25% (2:3 v/v). Las suspensiones fueron agitadas en un vórtex durante 45 s y centrifugadas a 12000 rpm y 4°C durante 20 min. Los sobrenadantes se filtraron mediante filtros jeringa de Nylon de 45 µm y se almacenaron a -20°C. Los compuestos fenólicos individuales fueron separados y

cuantificados mediante HPLC (Euroline, Knauer) utilizando una columna C18 (150 mm x 4,6, 5,0 μm ; Pinnacle II, Restek) con solventes A (H_3PO_4 0,25% v/v en H_2O MilliQ) y B (acetonitrilo). La elución de los compuestos de interés se realizó mediante un gradiente lineal de 8% B a 0 min, 12% B a 6 min, 20% B a 10 min, 50% B a 23 min hasta los 30 min y nuevamente 8% B entre los 30 y 40 min para volver a equilibrar la columna. El flujo de fase móvil se mantuvo constante a 1 mL min^{-1} . El volumen de muestra inyectado fue de 20 μL y la elución se monitoreó con un detector de arreglo de diodos (DAD) a 230 (para detectar DTGs), 305 y 320 nm respectivamente (compuestos fenólicos). Los distintos isómeros de ácido clorogénico y la rutina fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención y espectros UV-Vis con los de estándares comerciales; las cantidades fueron cuantificadas en base a curvas de calibración y expresadas como μmoles por gramo de tejido seco ($\mu\text{mol/g}$). Las poliaminas conjugadas (cafeoilputrescina e isómeros de dicafeolesperimidina) fueron identificadas en base a sus tiempos de retención y comparando sus espectros UV/Vis con los previamente reportados en el laboratorio del Dr. Baldwin. Estos compuestos fueron cuantificados como equivalentes de ácido clorogénico. Los niveles de glicósidos de terpenoides (DTGs) fueron cuantificados en base al área de pico comparativamente entre tratamientos.

Determinación relativa de acumulación de compuestos fenólicos en la epidermis foliar

La acumulación de compuestos fenólicos sobre la epidermis fue estimada de forma indirecta cuantificando la fluorescencia inducida de la clorofila (RF_{UV}) siguiendo el método descrito por Mazza et al. (2000).

Análisis de expresión génica

Purificación de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de RNA para la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó siguiendo el método de LiCl-fenol/cloroformo descrito por Izaguirre et al. (2003). Aproximadamente 100 mg de tejido congelado por muestra fueron pulverizados en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se resuspendió en tubos eppendorf de 1,5 mL con una mezcla de 1 mL de buffer de

extracción (0,18 M Tris-HCl pH 8,2; 0,09 M LiCl; 4,5 mM EDTA; 1% m/v SDS) y 0,34 mL de fenol ácido:cloroformo (Amersham Biosciences). La suspensión homogeneizada se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y 4°C. El sobrenadante (aproximadamente 0,7 mL) se traspasó a un nuevo tubo y se le agregó igual volumen de cloroformo (para quitar restos de fenol). La mezcla se centrifugó nuevamente durante 20 min a 10.000 rpm y 4°C y a la fase acuosa resultante se le agregó una solución de LiCl hasta alcanzar una concentración final 2 M. Las muestras se mezclaron bien y los ácidos nucleicos se dejaron precipitar durante toda la noche a 4°C. Luego del paso de precipitación las muestras fueron centrifugadas 20 min a 10.000 rpm y 4 °C. El precipitado se resuspendió en 200 μ L de H₂O MilliQ y 40 μ L de acetato de sodio 3 M. Una vez resuspendidas las muestras, se agregaron 1,1 mL de etanol absoluto y se precipitaron los ácidos nucleicos incubando las suspensiones a -20°C por 2 h. Se realizó una nueva centrifugación a 10.000 rpm y 4°C durante 30 min y se lavaron los precipitados con 400 μ L de etanol absoluto 70% v/v. Luego de una última centrifugación de 20 min a 10.000 rpm y 4°C, los precipitados se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en agua MilliQ. La calidad del ARN extraído fue evaluada mediante el análisis de movilidad electroforética en geles de agarosa al 1% y la cantidad y pureza se estimaron por espectrofotometría UV/Vis midiendo la absorbancia de diluciones de muestra a 230, 260 y 280 nm.

El ARN total extraído fue tratado con DNAsa RQ1 (Promega) según el protocolo del fabricante para eliminar cualquier posible contaminación con ADN genómico. Una vez realizado el tratamiento con DNAsa, aproximadamente 2 μ g del ARN total purificado fueron utilizados para la síntesis de ADNc por PCR reversa, utilizando la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT, Promega) según el protocolo indicado por el fabricante: 1 μ g de oligo dT, 25 μ mol de mezcla de dNTPs, 200 unidades de enzima y buffer de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT) en un volumen final de 25 μ L. El ARN total fue incubado con el oligo dT a 75 °C durante 5 min y la retrotranscripción se llevó a cabo en un solo ciclo de 60 min a 42 °C con un paso final de incubación de 15 min a 70 °C para eliminar cualquier traza de actividad de DNAsa. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Cuantificación de la expresión génica por PCR en Tiempo Real

El ADNc preparado a partir del ARN total de los extractos vegetales fue utilizado en una dilución 1/10 como templado para la cuantificación relativa de niveles de expresión génica. La cuantificación se realizó por PCR en Tiempo Real (7500 PCR Real Time PCR System, Applied Biosystems). Las secuencias de los *primers* utilizados se detallan en la Tabla 1; las secuencias fueron diseñadas utilizando el software *Primer Express 1.5* (Applied Biosystems), a partir de la secuencia codificante de los genes correspondientes de *N. attenuata* ó *N. tabacum* publicadas en bases de datos públicas (Pubmed). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la *Universal SYBR Green Master Mix* (Roche Applied Science) que contiene ADN polimerasa, dNTPs, el buffer de reacción y SYBR Green como indicador de fluorescencia para la cuantificación de los niveles de amplicones; el ADNc en una dilución 1/10 y los *primers* en una concentración final de 500 nM. Para la amplificación se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante para cuantificación absoluta: una etapa inicial de activación de la polimerasa a 94°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 15 seg y 1 min a 60°C.

| Gen | Primer Forward (5'→3') | Primer Reverse (5'→3') |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>TPI</i> | TCAGGAGATAGTAAATATGGCTGTTCA | ATCTGCATGTTCCACATTGCTTA |
| <i>CHS</i> | TGATGTACCAACAGGGTTGCTT | TTGTTGTTTTTCAGCCAAGTCCTT |
| <i>ACTIN</i> | TTTCCTGGAATTGCTGATAGGATGA | AGCCAAAATAGAACCTCCAATCCAA |

Tabla 1: Secuencias de *primers* utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión génica. La denominación de los primers se encuentra relacionada al gen de interés: *TPI*, *INHIBIDOR DE PROTEASAS INSECTILES*; *CHS*, *CHALCONA SINTASA*; *ACTIN*, control endógeno de actina.

Los niveles de expresión del gen de la actina (*ACTIN*) de *N. attenuata* fueron utilizados como control endógeno para normalizar diferencias entre muestras debidas a variaciones en la cantidad de templado. Los niveles de expresión génica normalizados para cada gen de interés fueron expresados como niveles de expresión relativa respecto del tratamiento control.

Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos fue llevado a cabo utilizando el programa INFOSTAT (versión profesional 1.1). Los datos de compuestos fenólicos

solubles fueron analizados usando un ANOVA de tres factores (con el tratamiento de UV-B, el tratamiento de herbivoría simulada y el genotipo como factores). En el caso de las poliaminas conjugadas sólo se analizaron los datos del genotipo salvaje por medio de un ANOVA de dos factores, ya que en la línea *as-lox* los niveles de poliaminas conjugadas fueron prácticamente indetectables. Los datos de niveles de JAs fueron analizados utilizando un ANOVA de tres factores (con el tratamiento de UV-B, el tratamiento de herbivoría simulada y el tiempo de cosecha como factores). Para los análisis de expresión génica, la expresión de *CHS* fue analizada por medio de un ANOVA de tres factores, mientras que la expresión de *TPI* fue analizada sólo para el genotipo salvaje mediante un ANOVA de dos factores. Los datos provenientes de los experimentos de campo (RF_{UV} y los niveles de herbivoría) fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores con un diseño de bloques al azar. En los casos donde los términos de interacción resultaron significativos, las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Las transformaciones de datos necesarias para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad se indican al pie de cada figura.

Resultados

El UV-B y la herbivoría simulada inducen la acumulación de compuestos fenólicos en *N. attenuata* y esta acumulación requiere de una vía funcional de JAs.

En los experimentos realizados por Izaguirre et al.(2007), para comparar los perfiles de compuestos fenólicos inducidos por el UV-B y la herbivoría, se observó que tanto el tratamiento de UV-B como el de herbivoría simulada produjeron incrementos en los niveles totales de compuestos fenólicos. Dado el importante rol que tienen los JAs como hormonas iniciadoras del proceso de defensa, sería de esperar que líneas deficientes en JAs, al ser incapaces de producir la mayoría de las respuestas características de defensa, carezcan también de la capacidad de producir compuestos fenólicos con efecto antiherbívoro. Lo que no se sabía hasta el momento es si en las líneas deficientes en JAs se encuentra afectada también la inducción de compuestos fenólicos en respuesta a UV-B.

Para comprobarlo, se realizaron experimentos en invernáculo con un diseño similar al utilizado por Izaguirre et al. (2007), utilizando plantas de *N. attenuata* de genotipo salvaje (WT) y una línea deficiente en la producción de JAs por tener silenciada la expresión del gen de la LIPOXIGENASA3 (*as-lox*). La línea *as-lox* (A301) ha sido ampliamente utilizada en ensayos donde se investigó el rol de las oxilipinas en las respuestas de defensa contra insectos (Halitschke y Baldwin, 2003) y se ha probado que es mucho más sensible al ataque de insectos que el genotipo salvaje. Esta incapacidad de producir respuestas de defensa se puede contrarrestar con la aplicación exógena de JA (Halitschke y Baldwin, 2003; Paschold et al., 2007), por lo que en esta línea lo único que se encuentra afectado es la síntesis de JAs pero no los eventos que se encuentran río abajo.

Los niveles de compuestos fenólicos totales (medidos como A_{320} , ver materiales y métodos) en las plantas WT se incrementaron tanto en respuesta al tratamiento de UV-B como a la herbivoría simulada tal como era de esperarse; sin embargo las plantas *as-lox* mostraron niveles menores de compuestos fenólicos y presentaron una respuesta reducida al tratamiento de UV-B, mientras que no se

observaron incrementos significativos en respuesta al tratamiento de herbivoría (Figura 6)

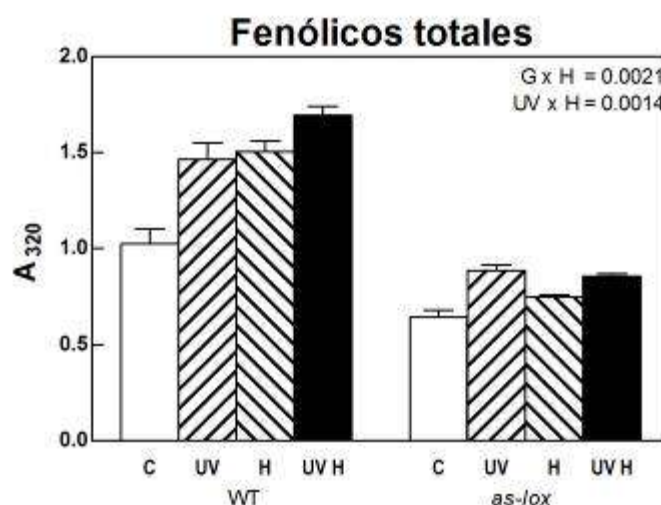


Figura 6: Efectos del UV-B y la herbivoría simulada sobre la acumulación de compuestos fenólicos solubles en *N. attenuata*. Las plantas fueron cultivadas y tratadas en el invernáculo. Los tratamientos experimentales consistieron en una combinación factorial de tratamientos de UV-B, herbivoría simulada y genotipo de las plantas. C: Luz diurna, UV, luz diurna suplementada con radiación UV-B, H, luz diurna con tratamiento de herbivoría simulada, UVH, radiación UV-B y herbivoría simulada. Las muestras de tejido se tomaron a las 72h luego del tratamiento de herbivoría. Las barras representan el valor medio de cada tratamiento + ES (n = 6 plantas individuales). Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis.

Estos resultados indican que la inducción por UV-B de al menos una fracción del conjunto de compuestos fenólicos foliares es dependiente de JAs. Como además es evidente que existen compuestos cuya inducción por herbivoría es también dependiente de JA, se evaluó a continuación el perfil de compuestos fenólicos en ambos genotipos en respuesta a los tratamientos de UV-B y herbivoría.

La inducción de compuestos fenólicos que responden en forma similar al UV-B y la herbivoría simulada requiere una vía funcional de JAs

El perfil de compuestos fenólicos fue evaluado por HPLC a partir del tejido foliar. En los cromatogramas de plantas WT pudieron identificarse siete compuestos fenólicos distintos, además de nicotina y DTGs (Figura 7).

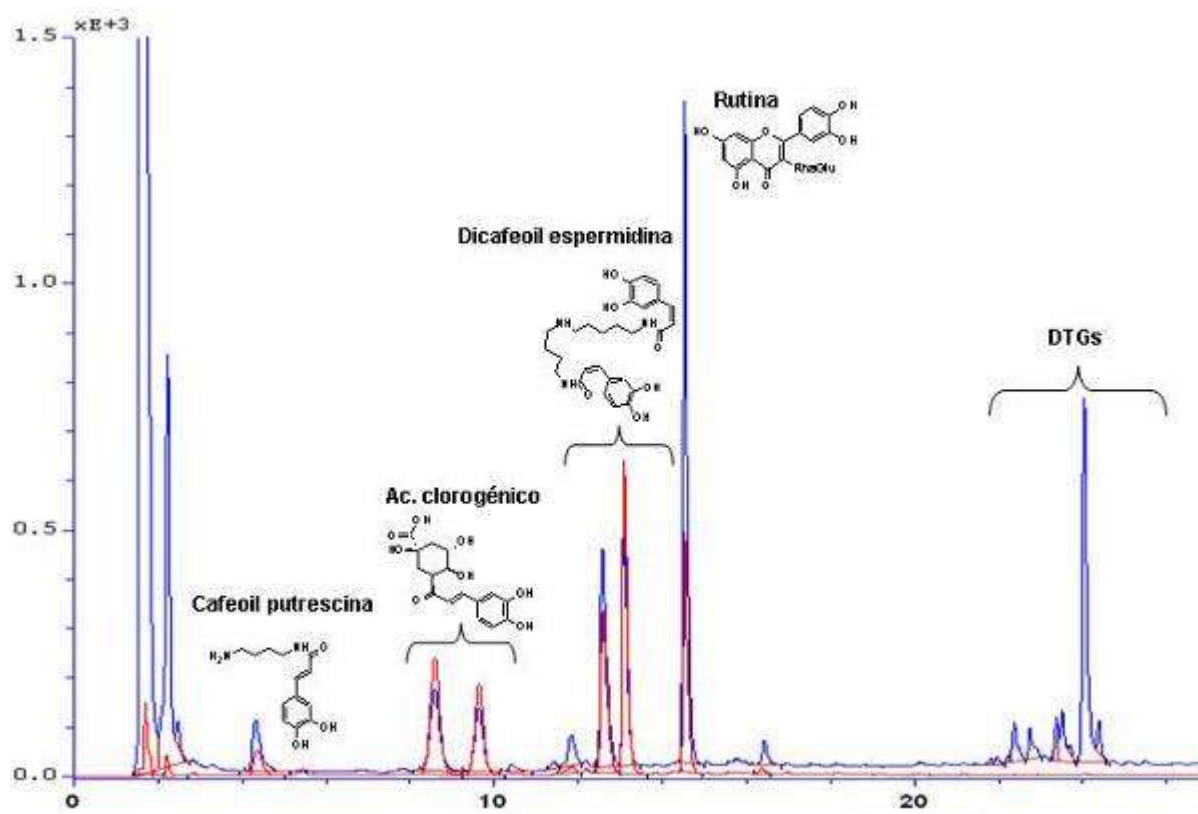


Figura 7: Perfil cromatográfico de un extracto foliar de *N. attenuata*. El perfil corresponde al genotipo WT. La línea roja corresponde a los picos registrados a 320 nm mientras que la azul corresponde a los picos registrados a 230 nm.

Entre los compuestos fenólicos identificados se encuentra la rutina (compuesto C15 y el flavonoide soluble mayoritario en *N. attenuata*), dos isómeros del ácido clorogénico, y tres conjugados de ácidos hidroxicinámicos con poliaminas (cafeoilputrescina, y dos tipos de cafeoilespermidina). Estos compuestos serán discutidos en dos grupos separados, de acuerdo a su patrón de respuesta y a la dependencia de JAs para su inducción:

Grupo 1

Comprende a la rutina y a los isómeros de ácido clorogénico (Figura 8). Estos metabolitos fueron claramente inducidos por el tratamiento de UV-B pero no presentaron cambios significativos frente al tratamiento de herbivoría simulada. Estos datos concuerdan con publicaciones recientes (Pandey y Baldwin, 2008; Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012) que encuentran patrones similares al exponer plantas de *N. attenuata* a la radiación UV-B ambiental o al someterlas a tratamientos de herbivoría simulada con secreciones orales de *M. sexta*.

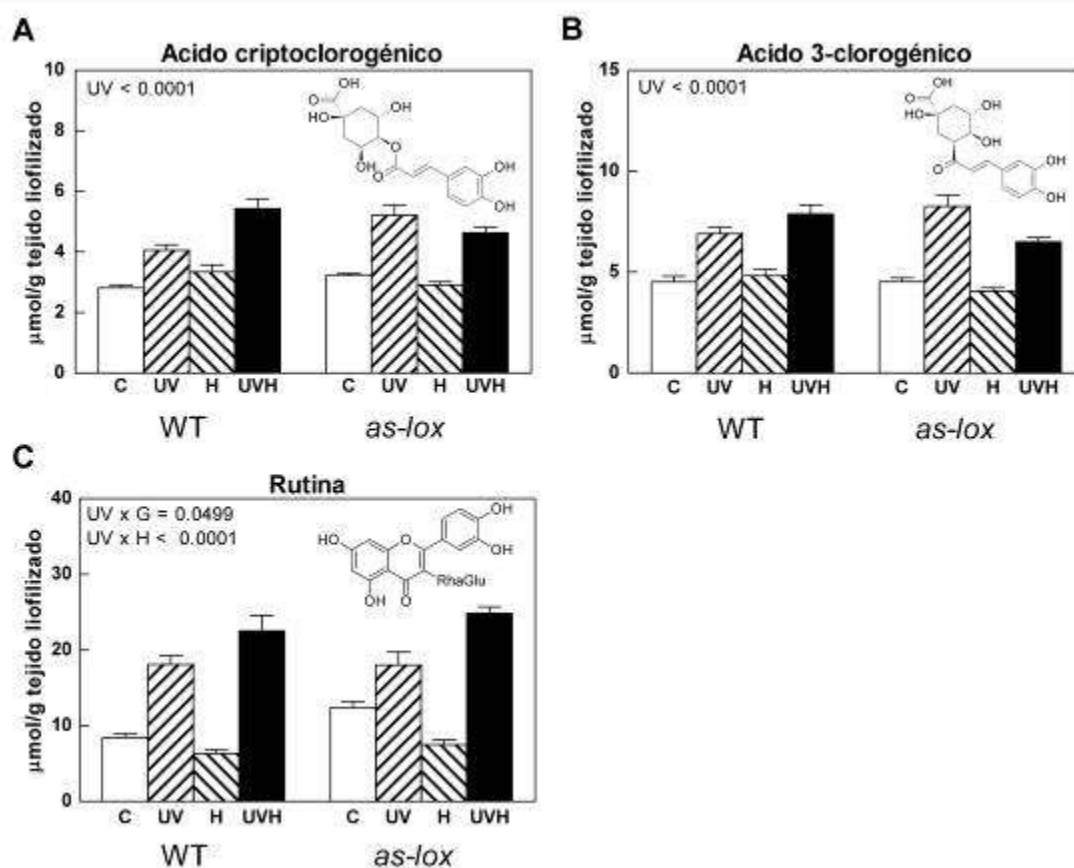


Figura 8: Perfil de compuestos fenólicos del grupo 1. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 6 plantas individuales). H, tratamiento de herbivoría; UV, tratamiento lumínico de UV-B; G, genotipo. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Los compuestos pertenecientes a este grupo mostraron además niveles y patrones de respuesta similares en las plantas *as-lox*, siendo probablemente los responsables de la respuesta a UV-B observada para los fenólicos totales (Figura 6) en estas plantas.

Grupo 2

Los conjugados de poliaminas (cafeoilputrescina y dos dicafeoilespermidinas) fueron significativamente inducidos por el tratamiento de UV-B en las plantas WT, así como también se incrementaron en respuesta al tratamiento de herbivoría simulada. Estos compuestos no se encontraron en niveles detectables en las plantas *as-lox*, lo que explicaría las diferencias observadas para los fenólicos totales (Figura 9).

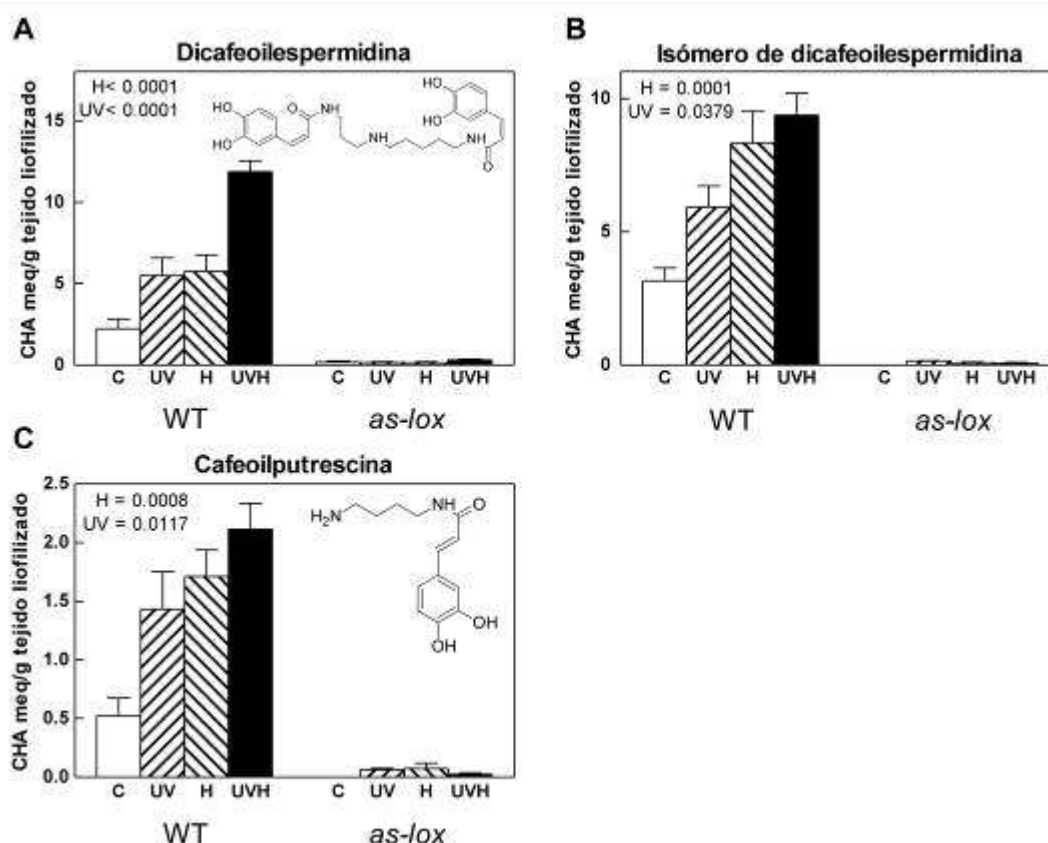


Figura 9: Perfil de compuestos fenólicos del grupo 2. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 6 plantas individuales). H, tratamiento de herbivoría; UV, tratamiento lumínico de UV-B. El análisis estadístico se realizó con los datos correspondientes a las plantas WT únicamente.

Se ha demostrado en trabajos previos (Paschold et al., 2007) que se requiere de una vía de JA funcional para la acumulación de cafeoilputrescina en plantas de *N. attenuata* en respuesta a la herbivoría, sin embargo, estos experimentos constituyen la primera evidencia de que la vía de JA también es necesaria para la acumulación de estos compuestos en respuesta al UV-B.

Es importante destacar que la incapacidad de las plantas *as-lox* de producir poliaminas conjugadas se debe solamente a la deficiencia en la producción de JAs que tienen estas plantas, ya que al rociarlas con MeJA se restituye la capacidad de sintetizar poliaminas conjugadas en niveles similares a las plantas WT (ver Apéndice).

Con respecto a otros metabolitos de defensa que se encuentran comúnmente en la fracción soluble de extractos foliares (como los DTGs, (Keinänen et al., 2001)) el análisis de perfiles por HPLC demostró que aunque los DTGs son claramente inducibles por herbivoría y dependen de la vía del JA, no sufrieron cambios frente a los tratamientos de UV-B (Figura 10).

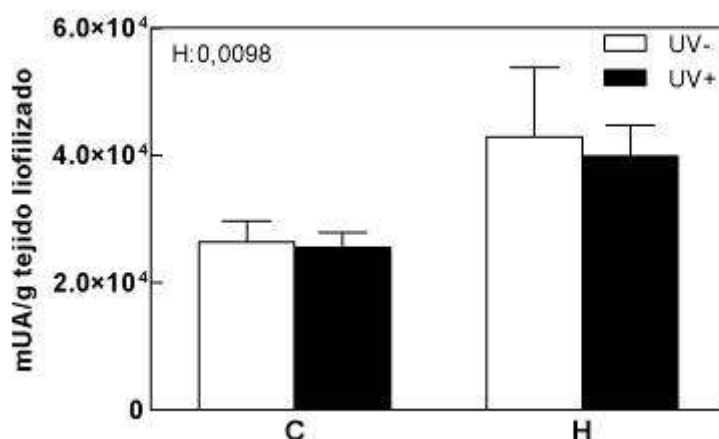


Figura 10: Cuantificación de DTGs. En *N. attenuata* los DTGs se incrementaron significativamente luego del daño simulado, mientras que la radiación UV-B no tuvo efectos sobre la acumulación de estos compuestos. Las determinaciones se realizaron a partir de tejido vegetal liofilizado cosechado a las 72 h luego del tratamiento de herbivoría simulada. H, tratamiento de herbivoría; UV, tratamiento lumínico de UV-B. Las columnas representan la media de cada tratamiento + ES (n = 6 plantas individuales).

En conclusión, algunos compuestos fenólicos que se acumulan en respuesta a herbivoría son inducibles también por la radiación UV-B, y su inducción requiere de JA. Otros compuestos fenólicos (como la rutina y el ácido clorogénico), en cambio, son inducidos por el UV-B independientemente de la vía del JA. Por otro lado, no todos los metabolitos de defensa inducibles por JAs son inducibles por UV-B, como puede verse con respecto a los DTGs.

El UV-B incrementa la expresión de proteínas de defensa inducidas por la herbivoría

Si bien no se encontró efecto del UV-B sobre otros metabolitos secundarios solubles como los DTGs, existen evidencias previas de que el UV-B puede tener efectos sobre la inducción de defensas proteicas. Experimentos previos con *N. attenuata* realizados en condiciones de invernáculo (Izaguirre et al., 2003) han demostrado que plantas expuestas al UV-B contienen mayores niveles de transcritos correspondientes al gen del inhibidor de proteasas insectiles (*TPI*). En los experimentos realizados por Izaguirre et al. (2003) también se observó una mayor actividad de TPI en extractos de hojas expuestas simultáneamente al UV-B y a la herbivoría simulada. Los TPIs son proteínas inducibles por JA y herbivoría que tienen como efecto último la reducción de la calidad alimenticia del tejido y han sido descriptos como componentes sumamente importantes de la defensa de *N. attenuata* contra *M. sexta* y otros lepidópteros (Zavala y

Baldwin, 2004; Zavala et al., 2004). Cabe preguntarse si el efecto del UV-B sobre la expresión de los TPIs es observable aún en ausencia de una vía de JA funcional.

La expresión del gen *TPI* fue evaluada en experimentos realizados en condiciones de invernáculo, con un diseño similar al utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos. A diferencia de los experimentos anteriores, las cosechas se realizaron a las 24 h de la aplicación del tratamiento de herbivoría, debido a que la inducción de transcriptos y la producción de metabolitos secundarios son eventos que ocurren en escala temporal distinta.

El análisis de los niveles de transcriptos por PCR en Tiempo Real mostró que la expresión del gen de *TPI* es inducida por el tratamiento de herbivoría simulada (Figura 11), tal como se ha determinado en estudios previos. Además, la inducción de este gen en respuesta a herbivoría requiere claramente de una vía de JA funcional, ya que los niveles de transcriptos en las plantas *as-lox* fueron prácticamente indetectables. A diferencia de lo observado por Izaguirre et al.(2003), el tratamiento de UV-B, por si solo, no aumentó en forma significativa los niveles de transcriptos de *TPI*. Sin embargo, el tratamiento de UV-B si incrementó significativamente la respuesta de las plantas a la herbivoría simulada, dado que los niveles de expresión registrados para los tratamientos de herbivoría fueron mayores en las plantas que habían sido expuestas al UV-B (Figura 11).

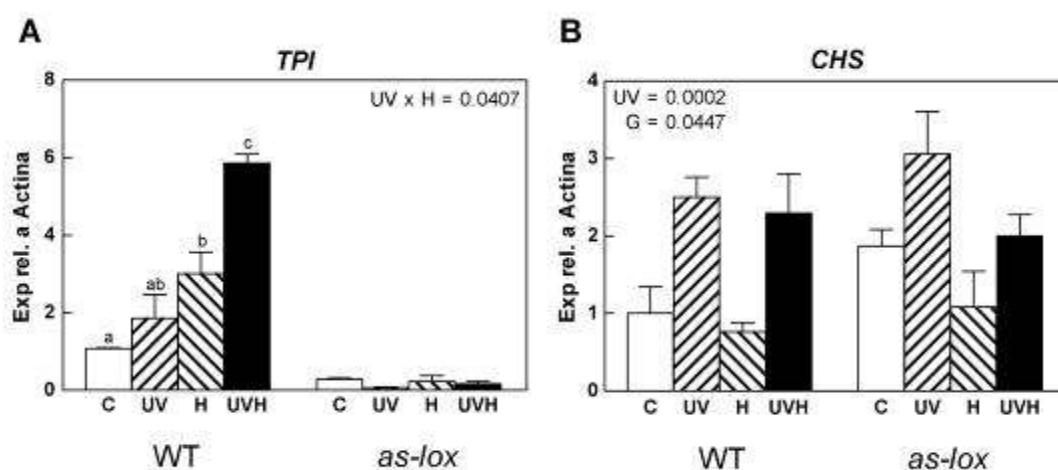


Figura 11: Expresión de genes en respuesta a los tratamientos de UV-B y herbivoría simulada. **A)** Expresión del gen del INHIBIDOR DE PROTEASAS (*TPI*). **B)** Expresión del gen de CHALCONA SINTASA (*CHS*). Las barras representan la media de cada tratamiento (n = 3, cada réplica biológica es la

combinación de tres plantas individuales). H, tratamiento de herbivoría; UV, tratamiento lumínico de UV-B; G, genotipo.

El patrón de expresión observado para el gen de *TPI* no fue observado en genes involucrados en respuesta al UV-B, como *CHALCONA SINTASA* (*CHS*, Figura 11-B). Este gen está involucrado en la síntesis de flavonoides, y en los experimentos realizados respondió únicamente al tratamiento de UV-B en forma independiente del JA, ya que se expresó tanto en las plantas WT como en las *as-lox*, en concordancia con el patrón de fenólicos observado.

La exposición a dosis de UV-B similares a las del ambiente natural no produce incrementos en los niveles de JAs

Debido a que tanto la producción de compuestos fenólicos en común entre la herbivoría y el UV-B como la inducción en los niveles de expresión de *TPI* son dependientes de la vía del JA, podría pensarse que el efecto del UV-B sobre estos eventos se debe a una inducción directa de los niveles de JAs causada por la exposición a la radiación. Como se mencionó anteriormente en la introducción general, la inducción por UV-B de la vía de JAs ya fue reportada (Conconi et al., 1996; A.-H.-Mackerness et al., 1999); sin embargo el uso de dosis de UV-B poco realistas en los ensayos realizados en los trabajos citados podría no reflejar satisfactoriamente los cambios metabólicos que se producen en plantas expuestas a condiciones naturales de radiación. Por lo tanto, siguiendo un diseño experimental similar al de los experimentos anteriores se cuantificaron los niveles de JAs bioactivos en plantas WT.

Si bien los niveles de OPDA, JA, los derivados hidroxilados 11-OH-JA y 12-OH-JA y el conjugado bioactivo de JA con isoleucina (JA-Ile) fueron inducidos por el tratamiento de herbivoría, ninguno de estos compuestos fue inducido únicamente por la exposición de las plantas a UV-B ni se vieron incrementos diferenciales debidos al UV-B en los tratamientos de herbivoría (Figura 12).

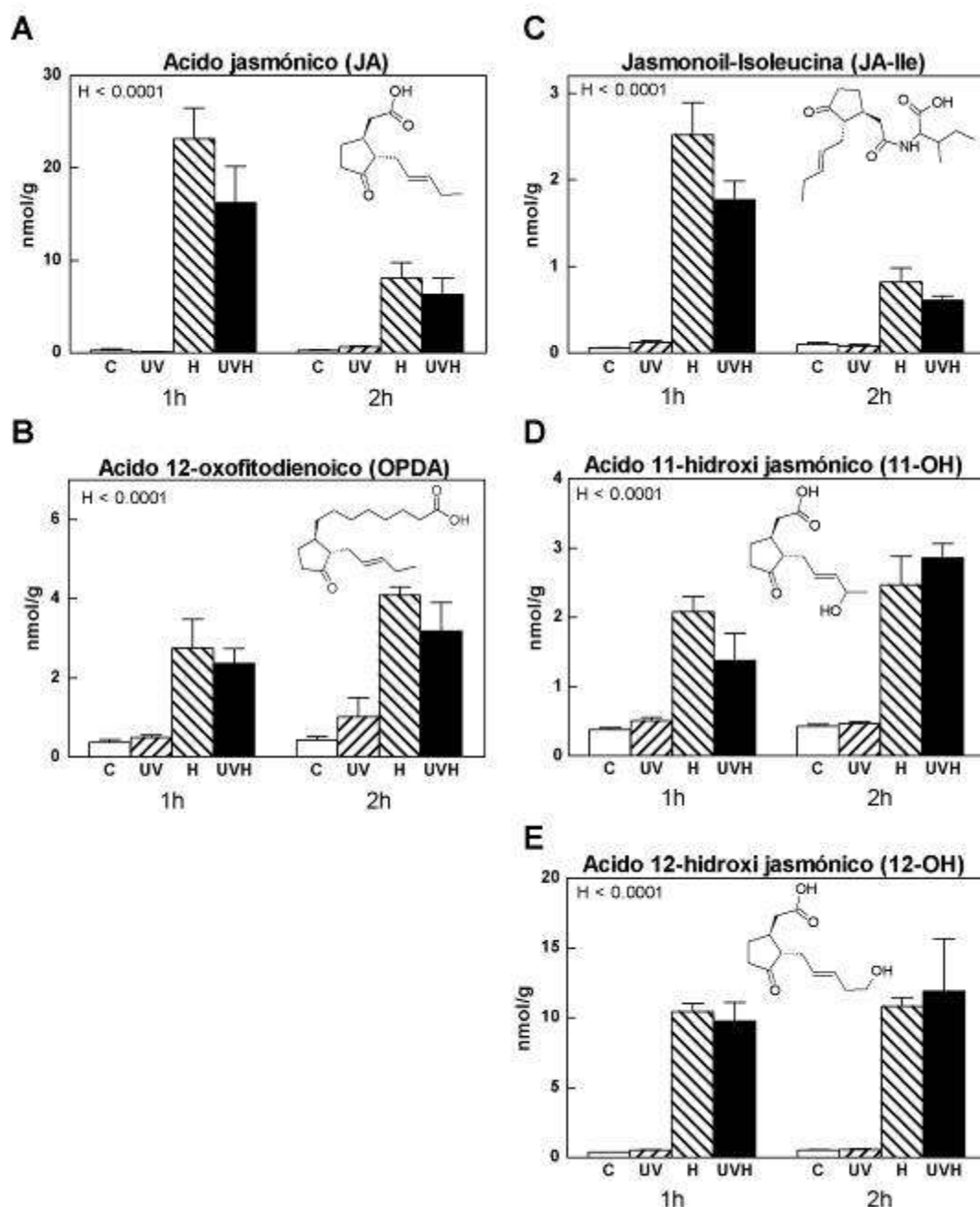


Figura 12: Niveles de JAs en *N. attenuata* en respuesta a la radiación UV-B y a la herbivoría simulada. Las determinaciones se realizaron a partir de tejido vegetal cosechado a 1 y 2 h luego del tratamiento de herbivoría. Las barras representan la media para cada tratamiento + ES (n = 3, cada réplica biológica es un conjunto de 10 plantas individuales). C, control; H, tratamiento de herbivoría; UV, tratamiento lumínico de UV-B, UVH, combinación de los tratamientos de UV-B y de herbivoría. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Los resultados de este experimento demuestran que en las condiciones experimentales utilizadas, el UV-B no incrementa los niveles constitutivos de JAs ni modifica la inducción en respuesta a la herbivoría. En el caso de JA y Ja-Ile, incluso se

registró una tendencia a la disminución de estos metabolitos en plantas sometidas a la herbivoría y el UV-B, aunque no fue significativa.

El efecto del UV-B sobre la producción de defensas inducibles puede ser consecuencia de un incremento en la sensibilidad de los tejidos a los JAs

Dado que el tratamiento de UV-B por si solo no indujo incrementos en los niveles de JAs, resulta evidente que los efectos del UV-B sobre las defensas que involucran al JA no se encuentran a nivel de síntesis de la hormona o sus derivados.

Las hormonas vegetales son sustancias reguladoras responsables de integrar aspectos muy variados del crecimiento y desarrollo de las plantas (Leyser, 1998; Klee, 2004). Dada la variedad de eventos que regulan sería sorprendente que el único modo de acción de estas sustancias fuese a través de cambios en las concentraciones, ya que la síntesis *de novo* requiere de tiempos que no concuerdan con la velocidad de las respuestas que se regulan. Existen numerosos casos donde la regulación mediada por hormonas en plantas ocurre a nivel de transporte, cambios en niveles o afinidad a los receptores y reguladores que pueden producir cambios en la sensibilidad de los tejidos, ya que pueden producir variaciones en la respuesta a una misma cantidad de hormona. Con respecto a los JAs, los trabajos de Moreno et al. (2009) y Cerrudo et al. (2012) en *A. thaliana*, demuestran que señales de competencia lumínica entre plantas pueden modificar la sensibilidad de los tejidos a los JAs. Por lo tanto, el patrón de expresión de *TPIs* observado en respuesta al UV-B y a la herbivoría simulada, sumado a la ausencia de cambios en los niveles de JAs, podrían indicar que el efecto del UV-B que involucra la vía de JAs se encuentra a nivel de sensibilidad de tejidos.

Para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de tipo dosis-respuesta a la aplicación exógena de MeJA en plantas WT. El experimento fue llevado a cabo con un diseño de dos factores completamente cruzado (tratamiento lumínico y dosis de MeJA)

El análisis de los niveles de transcritos de *TPI* por PCR en Tiempo Real mostró que la expresión de este gen se incrementa en función de la dosis de MeJA aplicada (Figura 13).

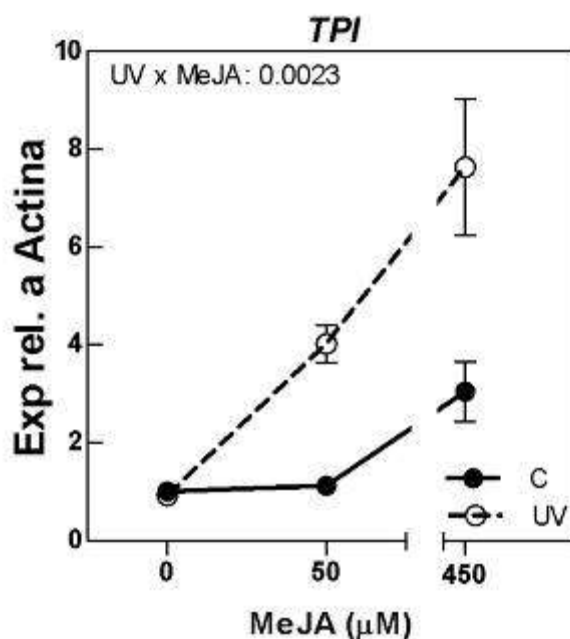


Figura 13: Efectos del UV-B sobre la sensibilidad de las plantas a los JAs. Las determinaciones de niveles de expresión génica se realizaron sobre tejido vegetal cosechado a las 24h luego de la aplicación de los tratamientos de MeJA. Cada punto de la curva representa la media del tratamiento \pm ES ($n = 3$, cada réplica biológica es un conjunto de tres plantas individuales) UV, tratamiento lumínico de UV-B; MeJA, tratamiento de aplicación exógena de metil jasmonato. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Como se vio anteriormente, el UV-B *per se* no produjo incrementos en la expresión de *TPI*, sin embargo se observó un incremento altamente significativo de la expresión de *TPI* en respuesta a la aplicación de MeJA en las plantas que fueron expuestas al tratamiento de UV-B. Esto indica que el UV-B tiene la capacidad de modular la sensibilidad de los tejidos a JA.

La presencia de una vía funcional de JAs es necesaria para el efecto antiherbívoro del UV-B solar en condiciones naturales

Como se mencionó anteriormente, el interrogante sobre la superposición de vías de respuesta a UV-B y herbivoría surgió durante experimentos de exclusión de UV-B solar realizados en ambientes naturales, donde se observaban menores evidencias de herbivoría en plantas que habían sido cultivadas en condiciones de exposición al UV-B respecto de aquellas que habían sido cultivadas en condiciones de atenuación de la radiación UV-B incidente (Mazza et al., 2000; Izaguirre et al., 2003; Rousseaux et al., 2004; Caputo et al., 2006). Este efecto en condiciones naturales puede deberse en parte

a efectos del UV-B sobre los insectos mismos, ya que algunos insectos son capaces de percibir la radiación UV-B y reaccionar en consecuencia (Mazza et al., 2002; 2010).

Para determinar si el efecto del UV-B sobre la herbivoría natural requiere de una vía de JA funcional, se llevó a cabo un experimento en condiciones de campo para evaluar los niveles de herbivoría natural en plantas WT y *as-lox*. Los signos de herbivoría que se registraron sobre las hojas de *N. attenuata* fueron causados principalmente por thrips de la especie *Thrips tabaci* y *Frankliniella* spp. (Thysanoptera: Thripidae, Figura 14).



Figura 14: Hojas de rosetas de *N. attenuata* creciendo en los experimentos de campo donde se ve el desarrollo de larvas (izquierda) y adultos (derecha) de thrips.

Las plantas WT y *as-lox* acumularon compuestos fenólicos en la superficie foliar en niveles significativos al ser expuestas a la radiación UV-B solar (Figura 15-A), lo que se evidencia por la reducción de la fluorescencia de la clorofila a la luz UV (RF_{UV} (Mazza et al., 2000)). Los niveles de fenólicos foliares fueron significativamente menores en el genotipo *as-lox* (Figura 15-A) Las plantas *as-lox* sufrieron niveles de daño foliar significativamente mayores que los de las plantas WT, lo que es esperable dado que las plantas del genotipo *as-lox* carecen de JAs funcionales y por lo tanto son incapaces de inducir respuestas de defensa frente al ataque a herbívoros (Abe et al., 2009). Por otra parte, en coincidencia con los resultados de experimentos previos, las plantas WT expuestas al UV-B sufrieron niveles de daño significativamente menores que las no expuestas, confirmando el efecto antiherbívoro del UV-B. Sin embargo, el efecto del UV-B incrementando la resistencia no fue observado en las plantas *as-lox*

expuestas al UV-B solar (Figura 15-B), lo que demuestra que el UV-B produce cambios a nivel de tejidos en las plantas y estos cambios dependen de la vía del JA.

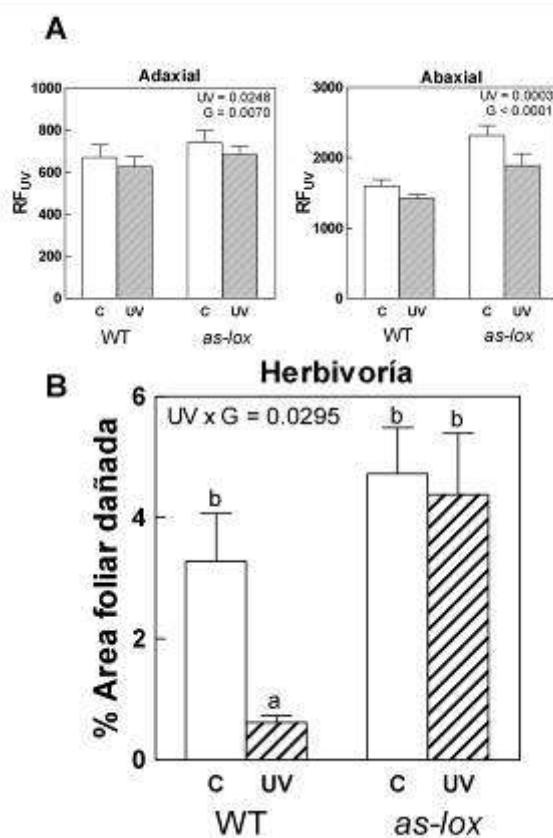


Figura 15: La exposición de las plantas de *N. attenuata* al UV-B solar en el campo reduce la herbivoría natural por thrips en las plantas WT pero no en las *as-lox*. **A)** Acumulación de fenólicos foliares en respuesta a UV-B determinada mediante la cuantificación de fluorescencia de la clorofila (Mazza et al., 2000). **B)** Daño foliar producido por thrips, calculado como porcentaje sobre el área foliar. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 4 bloques independientes. Cada bloque contiene tres plantas individuales de cada genotipo). UV, tratamiento lumínico de UV-B; G, genotipo. Las proporciones fueron transformadas con la función $\arcsin\sqrt{p}$ para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Discusión

Los experimentos presentados en este capítulo demuestran que dosis de radiación UV-B con niveles similares a los esperables en el ambiente natural afectan la expresión de defensas importantes en *N. attenuata*. Los resultados demuestran que parte de las defensas inducibles por el UV-B se activan a través de mecanismos que dependen del JA, mientras que otras parecerían actuar por vías independientes, ya que son observables aún en las plantas que no poseen una vía de JAs funcional. En base a la respuesta al UV-B y a la dependencia con la vía de los JAs, los compuestos estudiados podrían caracterizarse en tres grupos de respuesta:

- 1- Compuestos inducibles por el UV-B e independientes de la vía de JA.
- 2- Compuestos inducibles por el UV-B y dependientes de la vía de JA
- 3- Compuestos no inducibles por el UV-B, pero para los cuales el UV-B potencia la inducción por JAs

1-Compuestos inducibles por el UV-B e independientes de la vía del JA

Este grupo comprende a aquellos compuestos que son inducidos por la exposición a UV-B, sin que sus niveles se vean afectados por los tratamientos de herbivoría simulada, y que además se inducen en niveles comparables tanto en plantas WT como *as-lox*, lo que demuestra claramente su independencia de los JAs. Dentro de este conjunto se agrupan los compuestos flavonoides como la rutina y parte de los fenilpropanoides como los isómeros de ácido clorogénico.

La acumulación de flavonoides y otros compuestos de tipo C15 es una de las respuestas más características en plantas a la exposición a la radiación UV-B (Ballaré et al., 1995; Lavola et al., 1998; Ryan et al., 1998; Olsson et al., 1999; Hoffman et al., 2003; Tegelberg et al., 2004; Izaguirre et al., 2007; Kuhlmann y Müller, 2009). En los experimentos presentados en esta tesis se demuestra por primera vez que la acumulación de esos compuestos en respuesta a dosis ambientales de UV-B no requiere de la vía del ácido jasmónico (Figura 8C). Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en *N. attenuata*, en los cuales se observó que los niveles de rutina no se incrementaban luego del tratamiento de plantas con JAs (Keinänen et al., 2001; Lou y Baldwin, 2003) o herbivoría simulada (Kessler et al., 2004; Izaguirre et al., 2007). En el

presente estudio, a diferencia de los anteriores, la utilización de plantas deficientes en JAs como herramienta genética permite establecer claramente la independencia entre la producción de estos compuestos y la cascada de señalización de JAs. Es generalmente aceptado que el paso limitante en la biosíntesis de flavonoides se encuentra a nivel de la enzima chalcona sintasa, y en *Arabidopsis thaliana* la expresión del gen que codifica para esta enzima se encuentra estrechamente regulada por la vía de UVR8-COP1 de forma independiente de la vía de JAs (Favory et al., 2009). Los resultados obtenidos en los experimentos para la expresión del gen de *CHS* en *N. attenuata* concuerdan con lo observado a nivel de metabolito y con el patrón de expresión en *A. thaliana*.

Respecto al rol que puedan tomar la rutina y otros flavonoides en la defensa contra insectos herbívoros, existe evidencia que sugiere que podrían tener un efecto antiherbívoro (Elliger et al., 1981; Stamp y Osier, 1998; Hoffland et al., 2000), aunque estas evidencias varían de acuerdo al tipo de especie vegetal e insecto estudiado. En *N. attenuata* la rutina no parece tener un rol antiherbívoro destacado (Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012).

Los niveles de los isómeros de ácido clorogénico (del grupo de los fenilpropanoides) mostraron una clara inducción por el UV-B, pero presentaron incrementos prácticamente nulos con los tratamientos de herbivoría simulada (Figura 8 A-B). Si bien estas observaciones contrastan con los experimentos realizados por otros autores (Kessler et al., 2004; Izaguirre et al., 2007), concuerdan con otros trabajos publicados (Steppuhn et al., 2004; Wu et al., 2008; Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012). Es posible que las diferencias observadas se deban a diferencias en los protocolos de inducción o en la forma de manipulación de los tejidos al momento de la cosecha, dado que los tricomas glandulares de *N. attenuata* poseen polifenoloxidasas que entran en contacto con los fenólicos al producirse rupturas en el tejido foliar y que pueden alterar el contenido de ácido clorogénico, al ser este uno de sus sustratos preferidos (Li y Steffens, 2002). Sin embargo, las evidencias más recientes de la literatura señalan que al menos en *N. attenuata* los niveles de ácido clorogénico y sus isómeros no se ven alterados por tratamiento con JAs o herbivoría simulada, y la diferencia con los estudios anteriores probablemente se deba a la metodología utilizada para identificar los compuestos en los cromatogramas, ya que fácilmente pueden confundirse con las poliaminas conjugadas, de las que se hablará a continuación.

En cuanto al rol del ácido clorogénico como compuesto de defensa contra la herbivoría, existen evidencias de que puede ser un factor de resistencia importante contra el ataque de thrips en *Chrysanthemum* (Leiss et al., 2009) y contra *Helicoverpa zea* en algodón (Bi et al., 1997). En los experimentos presentados en este capítulo, los isómeros de ácido clorogénico fueron inducidos por el UV-B tanto en las plantas WT como en las *as-lox* (figura 8 A-B); sin embargo el incremento de la resistencia a thrips en plantas expuestas al UV-B fue solo observado en el genotipo WT. Esto podría deberse a que el ácido clorogénico es reducido a quinonas por las polifenoloxidasas de los tricomas glandulares y estas serían los metabolitos finales con efecto antiherbívoro. Como la inducción del gen de polifenoloxidasa (*PPO*) es dependiente de JA, los niveles de *PPO* son reducidos en las plantas *as-lox*, y esto explicaría la menor efectividad del ácido clorogénico en estas plantas.

2-Compuestos inducibles por el UV-B y dependientes de la vía del JA

Este grupo comprende a aquellos compuestos que son inducidos por la exposición a UV-B, y por los tratamientos de herbivoría simulada, y son los que además se encuentran severamente reducidos en las plantas *as-lox*. Esto último indicaría que estos compuestos dependen de una vía de JAs funcional para su producción.

Dentro de este conjunto se agrupan las poliaminas conjugadas cafeoilputrescina y los dos isómeros de dicafeoilspespermidina.

Estos compuestos fueron inducidos significativamente en las plantas WT tanto por el tratamiento de UV-B como por el tratamiento de herbivoría simulada (Figura 9), en concordancia con los experimentos realizados por Izaguirre et al.(2007) y Paschold et al.(2007). Sin embargo, estos compuestos no se encontraron en niveles detectables en las plantas *as-lox* ni fueron inducidos por ninguno de los tratamientos, indicando que la vía del JA no sólo es necesaria para la acumulación de estos conjugados (lo que ya había sido demostrado por Paschold et al. (2007), sino que también es indispensable para la producción de estos compuestos en respuesta a dosis de UV-B similares a las del ambiente natural. Con respecto a los mecanismos que regulan la inducción de estos compuestos, Gális et al., (2006) , utilizando cultivos de células BY2 de *N. tabacum*, demostraron que la aplicación de MeJA promueve la síntesis de conjugados de poliaminas con fenilpropanoides, y que este efecto se encuentra regulado por un factor de transcripción de tipo MYB R2R3 (NtMYBBJS1) inducible por MeJA. En *N. attenuata*, Pandey y Baldwin (2008) identificaron y describieron un factor de

transcripción similar (NaMYB8) inducible en plantas expuestas al UV-B en ambientes naturales, al que relacionaron con la inducción de los niveles de rutina e isómeros de ácido clorogénico por exposición a radiación UV-B.

En los últimos años, investigadores del mismo grupo encontraron además que NaMYB8 sería responsable también de la regulación de los niveles de poliaminas conjugadas en respuesta a herbivoría (Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012) y que estas poliaminas conjugadas juegan un rol importante en la defensa contra insectos. Aun resta por determinar cuál es el rol de NaMYB8 en la inducción de poliaminas conjugadas en respuesta a UV-B; en el caso de estar involucrado podría representar un punto de convergencia entre las respuestas al UV-B y a la herbivoría relacionadas a la producción de compuestos fenólicos en *N. attenuata* y posiblemente en otras solanáceas.

Otro grupo de compuestos inducibles por JA importantes en la defensa contra herbívoros en *N. attenuata* son los DTGs. En los experimentos realizados en esta tesis, los tratamientos de UV-B no produjeron cambios significativos en los niveles de estos metabolitos (Figura 10). Sin embargo, un trabajo reciente del grupo del Dr. Baldwin reportó incrementos en los niveles constitutivos de varios DTGs en plantas de *N. attenuata* expuestas al UV-B solar en condiciones de campo. (Đinh et al., 2012). A pesar del efecto inductor del UV-B sobre los niveles de DTGs observado por estos autores, encuentran una interacción negativa entre la exposición a UV-B y los tratamientos de herbivoría en la mayoría de los DTGs estudiados, un resultado inesperado en estas defensas inducibles por herbivoría. Las diferencias de los resultados de los experimentos de Đinh et al. (2012) con los experimentos presentados en esta tesis podrían deberse a la diferencia entre los tratamientos lumínicos utilizados, ya que en el caso de los experimentos de esta tesis la cuantificación de metabolitos secundarios se realizó en plantas sometidas a tratamientos de UV-B dentro del invernáculo y el balance de la radiación PAR/UV-B y otros factores ambientales no controlables pueden diferir en condiciones naturales, pudiendo también influir la edad de las plantas utilizadas.

3-Compuestos no inducibles por el UV-B, pero para los cuales el UV-B potencia la respuesta a JAs

La exposición de las plantas a los tratamientos de UV-B produjo incrementos en la expresión del gen de *TPI*, pero esto ocurrió únicamente en las plantas sometidas a tratamientos de herbivoría simulada (Figura 11), o aplicación exógena de MeJA (Figura

13). Estos resultados presentan una diferencia importante con experimentos previos publicados, en los cuales se utilizaron tratamientos de UV-C o dosis de UV-B en alta proporción respecto de la PAR suministrada a las plantas (Conconi et al., 1996; Stratmann et al., 2000). En los experimentos citados se observó un efecto altamente significativo de los tratamientos de irradiación por sí solos. Pero es probable que estos resultados se debiesen al uso de tratamientos de UV que por su intensidad producen daño directo en los tejidos, produciendo en última instancia una señal similar a la de daño mecánico o al daño producido por el herbívoro al masticar la hoja. Los resultados observados para la expresión de *TPI* en nuestros experimentos se encuentran en concordancia con los de estudios donde se ha utilizado mezclas de UV-B/UV-A (Stratmann et al., 2000), o dosis de UV-B ambientales (Izaguirre et al., 2003). En *N. attenuata*, el gen de *TPI* es un marcador típico de las respuestas a JA y herbivoría, por lo que la falta de efecto de la radiación UV-B *per se* sobre la expresión de *TPI* es consistente con los niveles de JAs observados en respuesta a los tratamientos lumínicos, ya que la exposición a UV-B no modificó los niveles de JAs producidos en respuesta a la herbivoría simulada (Figura 12). Por otro lado, el experimento de dosis-respuesta de MeJA y UV-B demuestra que los niveles de radiación UV-B natural sí incrementan la sensibilidad a JA en el tejido vegetal (Figura 13). Si bien está claro que este cambio en la sensibilidad de los tejidos implica una regulación diferencial de alguno de los eventos de la cadena de señales que involucra al JA, aún falta esclarecer mediante que mecanismos se produce este fenómeno.

En el trabajo recientemente publicado por Đinh et al.(2012), los niveles constitutivos de JA y Ja-Ile no fueron inducidos por la exposición al UV-B solar, coincidiendo con los resultados presentados en esta tesis. Sin embargo los niveles de JAs inducidos por la herbivoría simulada con secreciones orales de *M. sexta* resultaron significativamente mayores en plantas expuestas al UV-B una hora después de aplicado el tratamiento de herbivoría. A pesar de ello, tanto en el tratamiento de exclusión de UV-B como en el tratamiento de UV-B solar, las plantas presentaron niveles de jasmonatos similares al cabo de tres horas. Una posible explicación para la diferencia observada en los niveles de JAs, además de la diferencia en los tratamientos lumínicos, puede encontrarse en el tratamiento de herbivoría simulada utilizado. En los experimentos de Đinh et al.(2012), los niveles de JAs en respuesta a la secreción oral de *M. sexta* fueron mayores que los que se observaron al someter a las plantas a herbivoría

por *Tupiocoris notatus* (Heteroptera, Miridae), demostrando que la respuesta de JA presenta variabilidad respecto del herbívoro. En los ensayos de esta tesis, los tratamientos de herbivoría simulada fueron realizados utilizando secreciones orales de *S. frugiperda* y eso podría explicar las diferencias observadas en los niveles de JAs. Sin embargo, los tratamientos con secreciones orales de *S. frugiperda* fueron capaces de inducir compuestos fenólicos y transcriptos de *TPI* en niveles similares a los encontrados en otros trabajos con *N. attenuata* y *M. sexta*.

Más allá de las diferencias encontradas en respuesta a los tratamientos de herbivoría, es importante destacar que tanto los tratamientos de suplementación de UV-B en el invernáculo utilizados en esta tesis como los tratamientos de UV-B solar natural del trabajo de Đinh et al.(2012) no alteraron los niveles constitutivos de JAs en *N. attenuata*.

A pesar de los niveles mayores de JAs en respuesta a la herbivoría simulada encontrados en los tratamientos con UV-B solar, en los experimentos de Đinh et al. (2012), no se encontraron aumentos significativos en los transcriptos de *TPI*. Sin embargo, el nivel de transcriptos de *TPI* en respuesta a la herbivoría simulada presentó una tendencia al incremento en las plantas expuestas al UV-B al cabo de 12 horas de la aplicación del tratamiento de herbivoría. Dado que en los experimentos de esta tesis las mediciones de *TPI* fueron realizadas a las 24hs, la diferencia con los resultados de Đinh et al. (2012) podría deberse a los tiempos de cosecha, y teniendo en cuenta la tendencia observada por estos autores, la expresión de *TPI* presentaría una respuesta similar a los tratamientos de herbivoría en plantas expuestas al UV-B, tanto si se trata de UV-B suplementado en el invernáculo como UV-B natural en el campo.

Conclusiones

La radiación UV-B induce en *N. attenuata* respuestas que son dependientes de la vía del JA, como la acumulación de poliaminas conjugadas, mientras que otras como la inducción de flavonoides e isómeros de ácido clorogénico actuarían por una vía independiente de JA. El UV-B, además, produce cambios en la sensibilidad de los tejidos a JA, por mecanismos que aún no están del todo claros, pero que posiblemente involucren la modulación diferencial de elementos reguladores (factores de transcripción, represores, etc) involucrados en la cascada de señalización del JA.

N. attenuata es un modelo útil para el estudio de interacciones con factores ambientales y otros organismos a nivel ecológico. Sin embargo, si bien se conocen las secuencias de varios genes involucrados en respuestas de defensa y regulación hormonal así como también el conjunto de metabolitos involucrados, la información disponible sobre su genoma y los distintos elementos regulatorios involucrados en la producción y modulación de respuestas es, por el momento, limitada. Es por ello que para estudiar en mayor detalle el efecto del UV-B sobre la modulación de respuestas a herbivoría y otros factores bióticos, así como también el rol de los posibles receptores involucrados, en el siguiente capítulo se abordará el estudio de las respuestas al UV-B ambiental utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 3

Efectos de la radiación UV-B sobre la vía de señalización de JA y la producción de defensas en *Arabidopsis thaliana*:

Rol del fotorreceptor UVR8 en la inducción de defensas.

Los resultados de este capítulo se encuentran parcialmente publicados en:

Demkura PV, Ballaré CL (2012) UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant* **5**: 116–126.

Introducción

El objetivo general de esta tesis consiste en evaluar los mecanismos implicados en el incremento de la resistencia en plantas expuestas a la radiación UV-B solar. En base a los resultados obtenidos en los ensayos con *N. attenuata*, en el cierre del capítulo anterior se propuso que la radiación UV-B actúa sobre la resistencia a la herbivoría a través de distintos mecanismos, algunos de ellos dependientes de la vía del JA. Los resultados de los experimentos sugieren que el UV-B potencia algunas respuestas inducidas por el JA, como la expresión de ciertos genes que codifican para proteínas de defensa (p. ej. *TPI*) modulando la sensibilidad de los tejidos a la hormona.

Las evidencias obtenidas con *N. attenuata* conducen a indagar si los cambios en la sensibilidad de los tejidos están relacionados con cambios en los niveles de elementos reguladores de la vía de JA inducidos por la exposición a la radiación UV-B. En consecuencia, si este fuese el mecanismo implicado, sería de esperar que las plantas expuestas a la radiación UV-B en dosis similares a las del ambiente natural presenten cambios en el patrón de expresión de los elementos involucrados en la cadena de transducción de señales del JA.

Otro de los interrogantes que surgen, previamente planteado en la introducción general es si el incremento de la resistencia producido por la exposición a la radiación UV-B en ambientes naturales es consecuencia de la activación de una vía general de respuesta al estrés o involucra mecanismos de señalización por fotorreceptores, es decir, si se trata de una respuesta generalizada capaz de ser activada por otros factores abióticos o si se trata de una vía de respuesta activada por la percepción de la radiación UV-B a través de un fotorreceptor específico.

Como se mencionó en la introducción general, si bien la vía de JAs está ampliamente conservada en el reino vegetal y se conocen sus efectos sobre la producción de defensas en plantas en respuesta a herbivoría, infección por virus y hongos necrótrofos, la mayoría de los componentes y mecanismos involucrados en la vía de señalización conocidos hasta el momento han sido descritos y mejor caracterizados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta planta además ha sido utilizada en estudios realizados para caracterizar elementos y mecanismos involucrados en las respuestas a la radiación UV

y en años recientes se ha identificado y caracterizado al fotorreceptor de UV-B en esta especie.

Existen trabajos previos que investigan el rol del UV-B en la resistencia contra insectos y patógenos en miembros de las Brassicaceae (Foggo et al., 2007; Kuhlmann y Müller, 2009; Kuhlmann y Müller, 2011; Mewis et al., 2012, entre otros) , sin embargo son pocos los estudios que utilizan *A. thaliana* como modelo experimental para estudiar las interacciones entre el UV-B y la defensa (Caputo et al., 2006; Schenke et al., 2011), por lo que aún quedan pendientes algunas preguntas:

- a. ¿Qué efectos tienen dosis realistas de UV-B sobre la expresión de defensas dependientes e independientes de JA en *A. thaliana*?
- b. ¿Existe una interacción entre el UVB y la respuesta a JA en *A. thaliana*?
- c. ¿Qué papel juega el receptor UVR8; caracterizado recientemente, en la modulación de respuestas de defensa dependientes e independientes de JA?

***Arabidopsis thaliana* como modelo experimental**

Arabidopsis thaliana (L.) Heyn. es una planta perteneciente a la familia Brassicaceae (Figura 1). Es una planta pequeña que no presenta importancia agronómica y que ha sido ampliamente utilizada como organismo modelo debido a que es una planta fácil de cultivar y mantener en espacios reducidos. Además tiene un ciclo de vida relativamente corto (alrededor de 6 semanas desde la germinación hasta la producción de frutos) y la capacidad de producir silicuas con una gran cantidad de semillas.



Figura 1: *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0. **A:** Roseta de 2-3 semanas de edad. **B:** Roseta madura de 6 semanas de edad. **C y D:** Flores y silicuas en desarrollo.

La adopción de *A. thaliana* como planta modelo condujo a la secuenciación del genoma en el año 2000 (The Arabidopsis Initiative, 2000) y la obtención de mapas genéticos y físicos de sus 5 cromosomas. Además, al ser un organismo modelo muy utilizado se ha acumulado a nivel mundial gran cantidad de información sobre la función y los patrones de expresión de un gran número de genes y se conocen en detalle muchas de sus vías metabólicas y los factores que las regulan. Esta información se encuentra disponible en bases de datos de acceso libre como el TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>), el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://www.arabidopsis.info>) de Inglaterra y el BAR (The Bio-Array Resource for Plant Biology, <http://www.bar.utoronto.ca>) de la universidad de Toronto, entre otras. Además, se dispone de una enorme cantidad de ecotipos, líneas mutantes y líneas transgénicas que han sido generadas por laboratorios de todo el mundo y que se encuentran disponibles en centros de investigación como el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, www.abrc.osu.edu) de la universidad de Ohio en Estados Unidos.

La vía de señalización de JA en *A. thaliana*

Percepción y señalización en la vía de JAs

El módulo clave de señalización de JAs en *A. thaliana* está constituido por la proteína de tipo F-box COI1 (del inglés *coronatine insensitive 1*). La proteína COI1 funciona como parte de un complejo específico de ubiquitina ligasa E3 tipo SCF (denominado así por las proteínas que lo conforman, SKP1-Cul1-F-box). Los blancos del complejo SCF^{COI1} son proteínas represoras de la transcripción de genes involucrados en la vía del JA. En particular, existe una familia de proteínas represoras de JA que son blanco del complejo SCF^{COI1} denominadas proteínas JAZ (del inglés *jasmonate ZIM-domain*). Esta familia de represores tiene en común un dominio ZIM (una secuencia de 27 aminoácidos localizada en la región media de la proteína) y un dominio Jas (una secuencia de 22 aminoácidos cercana al C terminal de la proteína) (Chini et al., 2007). Los represores JAZ interactúan en ausencia de JA con factores de transcripción involucrados en la expresión de genes de la vía de jasmonatos, metabolitos secundarios, etc, impidiendo la expresión de los genes blanco.

Las proteínas JAZ y el complejo SCF^{COI1}, son capaces de interactuar en presencia del conjugado bioactivo JA-Ile. La proteína COI1 actuaría como receptor del JA-Ile, el cual permitiría la interacción del complejo SCF^{COI1} con los represores JAZ a través del dominio Jas de estos últimos (Figura 2). El complejo SCF^{COI1} al interaccionar con las proteínas JAZ por medio del JA-Ile, produce la adición covalente de ubiquitina a estos represores, marcándolos para su posterior degradación por el proteasoma 26s. Además de las proteínas JAZ existen correpresores transcripcionales como la proteína TOPLESS y la proteína mediadora NINJA que han sido descritos recientemente (Pauwels et al., 2010).

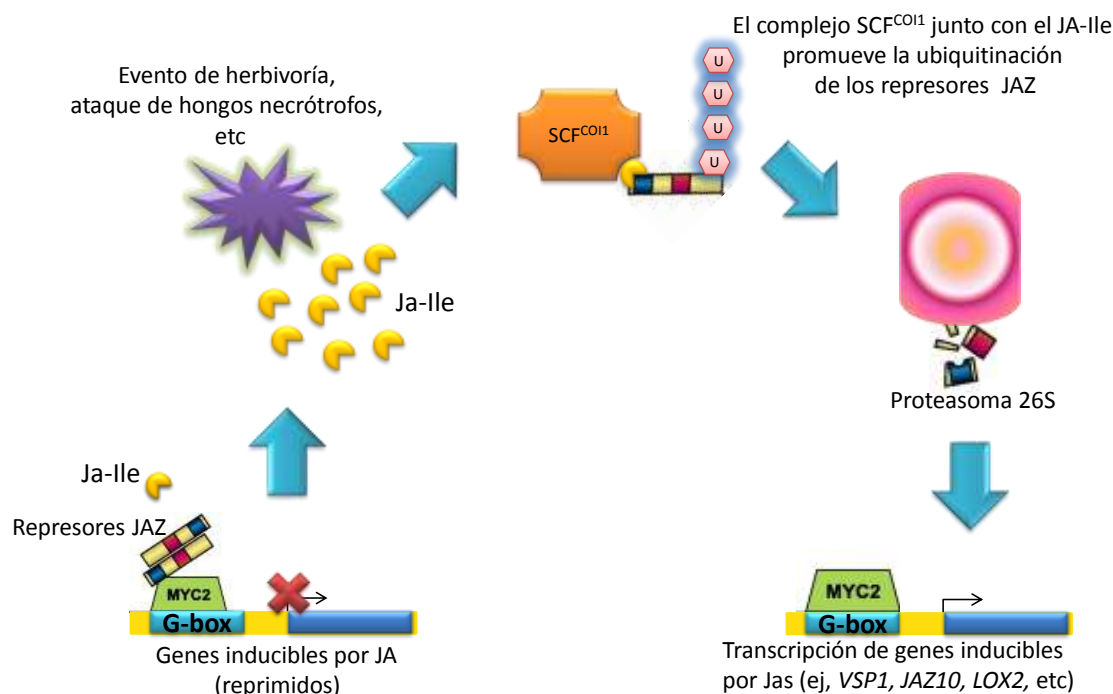


Figura 2: Esquema simplificado del mecanismo de acción de los represores JAZ. Imagen modificada de Chung et al., (2009).

La degradación de las proteínas JAZ dependiente del JA libera a los factores de transcripción reprimidos, cada uno de los cuales modula a su vez la expresión de conjuntos específicos de genes controlados por el JA, y como consecuencia se modifican los niveles de metabolitos secundarios específicos involucrados en la respuesta de defensa.

En *A. thaliana* existen 12 genes distintos que codifican para proteínas JAZ, los cuales a su vez pueden dar más de un producto por procesamiento diferencial durante la transcripción (*splicing* alternativo). En particular, existen diversas variantes de *splicing* de la proteína JAZ10 que presentan una mayor resistencia a la degradación y que serían las responsables de modular las respuestas que involucran la vía de los JAs, atenuando las respuestas a la hormona (Yan et al., 2007; Chung et al., 2009; Chung y Howe, 2009).

El factor de transcripción MYC2 (tipo bHLH) es el blanco mejor conocido de las proteínas JAZ en *A. thaliana* (Chini et al., 2009). Se ha demostrado que MYC2 está directamente involucrado en la producción de metabolitos secundarios; entre otras

respuestas se ha demostrado que regula positivamente la expresión de otros factores de transcripción y enzimas involucradas en la síntesis de antocianinas en respuesta a MeJA (Lorenzo et al., 2004; Dombrecht et al., 2007; De Geyter et al., 2012). Además MYC2 regula positivamente la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la defensa contra insectos, como la proteína VSP1 (del inglés *vegetative storage protein*) y la lipoxigenasa LOX2 (Dombrecht et al., 2007; Chung et al., 2008). Sin embargo también actúa negativamente sobre la expresión de otros genes, entre ellos el que codifica para la proteína ERF1 (del inglés *ethylene response factor 1*), un factor de transcripción inducible por JAs que regula positivamente la expresión de genes involucrados en la defensa contra hongos necrótrofos, como *Alternaria brassicicola* (Dombrecht et al., 2007).

Los JAs y la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos en *A. thaliana*

En *A. thaliana* y otras especies la vía del JA es esencial no sólo en la respuesta a insectos herbívoros masticadores sino también en la defensa contra hongos patógenos necrótrofos. En esta especie, tanto el ataque por insectos como la aplicación exógena de JA o la infección por hongos necrótrofos inducen la síntesis de PDF1.2 (del inglés *plant defensin*), una proteína de defensa que tiene propiedades antimicrobianas (Penninckx et al., 1996). La expresión del gen *PDF1.2* ha sido ampliamente utilizada como marcador de la inducción de respuestas mediadas por JA, y también se lo utiliza como marcador en el estudio de las respuestas de defensa contra hongos necrótrofos. La inducción de *PDF1.2* por acción de la herbivoría o por el ataque de hongos patógenos requiere del JA y el ET (Penninckx et al., 1998); coordinados a través de ERF1 (Lorenzo et al., 2003). Este factor de transcripción también regula positivamente la expresión de genes involucrados en vía del triptófano, a partir de la cual se sintetizan metabolitos con efecto antifúngico como los glucosinolatos indólicos y la fitoalexina camalexina (Dombrecht et al., 2007).

Uno de los organismos más utilizados en el estudio de la interacción entre plantas y hongos necrótrofos es *Botrytis cinerea*. Este hongo es la fase asexual de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, perteneciente a la división de los Ascomycetes, y es un organismo plaga que ha sido muy estudiado por las pérdidas económicas que causa en más de 200 especies de interés agronómico, principalmente en vid (Schumacher y Tudzynski, 2012). Además, ha sido frecuentemente utilizado en *A. thaliana* para caracterizar las

respuestas de defensa contra hongos necrótrofos, dado que se puede mantener y reproducir en el laboratorio sin grandes costos, es sencillo de utilizar en bioensayos por aplicación directa de suspensiones de esporas sobre la superficie de las hojas y el avance de la infección produce lesiones foliares fáciles de identificar y cuantificar.

Diversos estudios han demostrado que el desarrollo de la infección de *B. cinerea* se ve afectado por metabolitos secundarios de *A. thaliana*, como la camalexina y los glucosinatos indólicos (Kliebenstein et al., 2005; Gigolashvili et al., 2007) y que la respuesta de defensa depende de hormonas como los JAs y el ET, lo que lo convierte en un organismo útil para el estudio de respuestas de defensa reguladas por estas hormonas.

Metabolitos secundarios en *A. thaliana*

Compuestos fenólicos

La síntesis de compuestos fenólicos comienza a partir del aminoácido fenilalanina, el cual es transformado en ácido *trans*-cinámico por acción de la enzima PAL. Como en la mayoría de las plantas, en *A. thaliana* existen varias isoformas de la enzima codificadas por una familia de genes (*PAL1* hasta *PAL4*) (Raes et al., 2003). El ácido *trans*-cinámico es convertido posteriormente en *p*-cumaroilCoA por acción de las enzimas C4H y 4CL. El *p*-cumaroilCoA es un intermediario común en las vías de síntesis de fenilpropanoides (compuestos C3-C6) y de flavonoides y antocianinas (compuestos C15). A partir de este punto, la síntesis de compuestos fenólicos deriva hacia la producción de compuestos C15, en un proceso de síntesis que comienza con la acción de la CHS (la primera enzima de esta vía), o bien deriva hacia la síntesis de compuestos C3-C6, siendo la HCT la primera enzima involucrada y la responsable de la síntesis de cafeoilCoA, un intermediario clave en la síntesis de lignina y fenilpropanoides solubles (Besseau et al., 2007).

En la Figura 3 se muestra un esquema simplificado de las reacciones principales que llevan a la síntesis de compuestos fenólicos en *A. thalianas*, indicando también las principales enzimas involucradas. Los flavonoides solubles mayoritarios en el tejido foliar son la quercetina y el kaempferol, los cuales se encuentran unidos covalentemente a residuos de azúcares de distinta composición, dando origen a diferentes glicósidos (Jones et al., 2003). En cuanto a los fenilpropanoides, *A. thaliana* y otros miembros de la familia Brassicaceae se caracterizan por acumular mayormente ésteres de sinapatos, como la

sinapoyl colina, la sinapoyl glucosa o el sinapoyl malato (Fraser y Chapple, 2011). Tanto la sinapoyl glucosa como el sinapoyl malato se acumulan principalmente en el tejido foliar (Chapple et al., 1992; Fraser y Chapple, 2011).

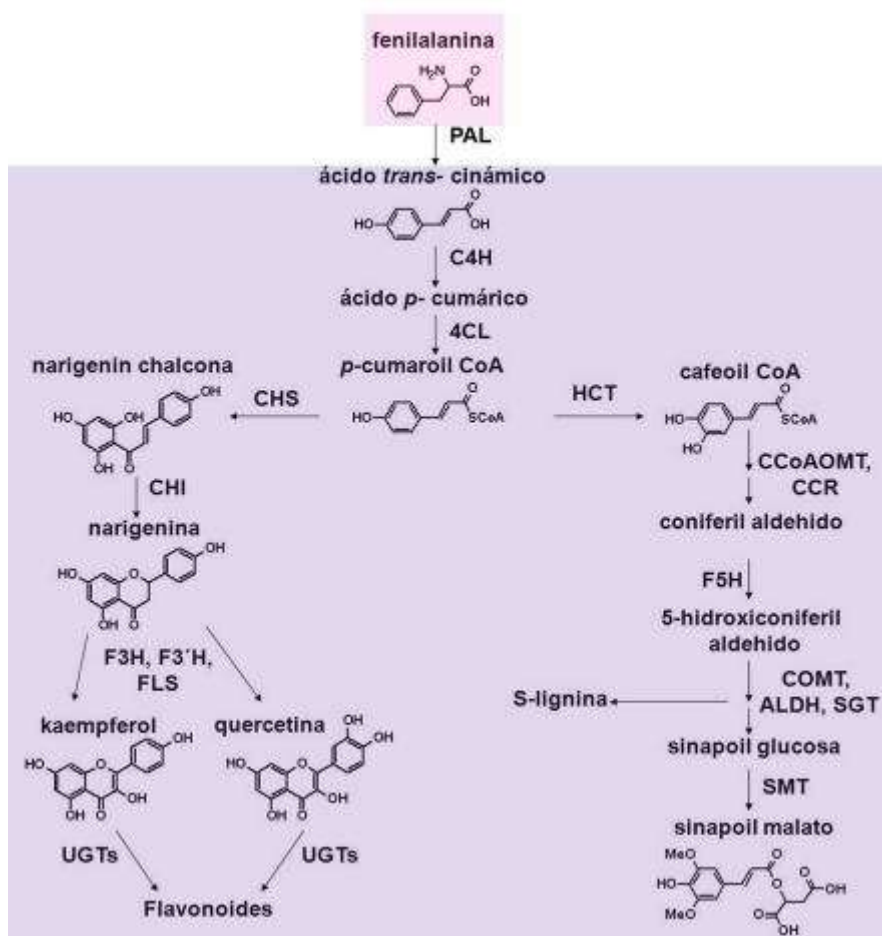


Figura 3: Esquema resumido de los principales pasos y enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos C15 (izquierda) y C3C6 (derecha) en *A. thaliana* (modificado de Besseau et al., (2007) y de AraCyc (<http://pmn.plantcyc.org/ARA/server.html>)). PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, C4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumaroyl CoA ligasa; HCT, hidroxicinamoyl CoA shiquimato/ quinato hidroxicinamoyl transferasa (HCT); CHS, chalcona sintasa, CCoAOMT, cafeoyl CoA O-metiltransferasa; CCR, cinamoyl CoA reductasa; COMT, cafeoyl O-metiltransferasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa, F5H, ferulato 5-hidroxilasa; SGT, sinapato UDP-glucosa sinapoyltransferasa; SMT, sinapoyl glucosa malato sinapoyltransferasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; UGTs, UDP glicosiltransferasas.

La obtención de líneas mutantes en enzimas específicas de la vía de síntesis de compuestos fenólicos ha proporcionado un conjunto de herramientas sumamente valiosas

para el estudio del rol que cumplen en *A. thaliana*. Uno de los fenotipos más comúnmente observados en líneas deficientes en la producción de flavonoides es la falta de coloración en la cobertura de la semilla. La búsqueda de mutantes que expresaran este fenotipo condujo a la obtención de la serie de líneas *transparent testa* (*tt*), un conjunto de mutantes afectadas en distintas enzimas de la vía de síntesis de flavonoides (Peer et al., 2001). Estas líneas han posibilitado el estudio del efecto de flavonoides individuales sobre el crecimiento y la respuesta a distintos factores ambientales como la radiación UV-B (Landry et al., 1995). En cuanto a los fenilpropanoides, la búsqueda de mutantes con fluorescencia al UV-B reducida en la epidermis foliar (indicativo de una menor acumulación de compuestos fenólicos), condujo al aislamiento de líneas como *sng1* que carece de la enzima SMT y acumula sinapoil glucosa en lugar de sinapoil malato (Lehfeldt et al., 2000); la serie de mutantes *ref* (del inglés *reduced epidermal fluorescence*), que consisten en mutaciones en diversas enzimas de la vía de síntesis de fenilpropanoides y que no solo acumulan menos sinapatos sino que presentan severas alteraciones estructurales por problemas en la formación de lignina (Ruegger y Chapple, 2001); y la mutante *fah1*, una línea afectada en el gen de la enzima F5H (ferulato-5-hidroxilasa). Esta mutante es deficiente en la acumulación de sinapoil malato en hojas y en la producción de lignina de tipo S (Chapple et al., 1992; Ruegger et al., 1999).

Glucosinolatos

Los glucosinolatos constituyen una familia de compuestos secundarios presentes principalmente en miembros de las Brassicaceae y otras familias relacionadas, con alrededor de 130 estructuras químicas conocidas (Fahey et al., 2001). Son compuestos ricos en azufre (S-glicósidos), que tienen en común una estructura central consistente en un anillo de β -D-glucopiranososa unido a una oxima sulfatada por medio de un átomo de azufre (Figura 4).

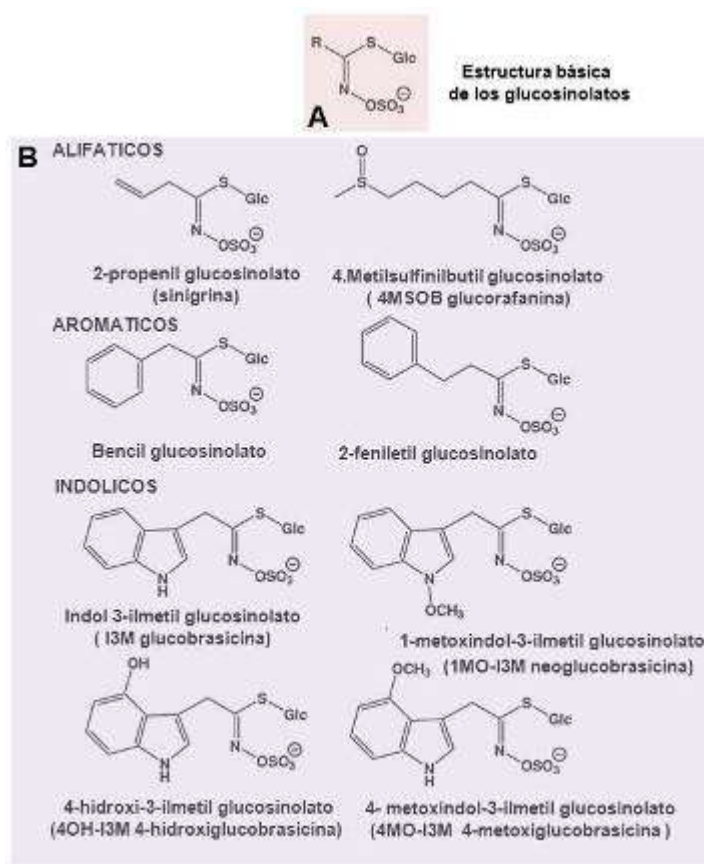


Figura 4: **A)** Estructura general de los glucosinolatos. La diversidad de estos compuestos radica en la naturaleza del grupo R, algunos de los cuales se muestran en (B). **B)** Glucosinolatos alifáticos, aromáticos e indólicos de *A. thaliana*. Modificado de Textor y Gershenzon (2009)

La diversidad de los glucosinolatos radica en la naturaleza del grupo R que se marca en la Figura 4, el cual deriva biosintéticamente de diversos aminoácidos. De acuerdo a la naturaleza del grupo R se los suele dividir en alifáticos (derivados de la metionina, alanina, leucina, isoleucina y valina), aromáticos (derivados de fenilalanina y tirosina) e indólicos (derivados del triptófano) (Fahey et al., 2001; Halkier y Gershenzon, 2006). Los glucosinolatos que se acumulan en el tejido vegetal tienen poca actividad biológica, pero luego de la ruptura producida en los tejidos por el ataque de insectos o patógenos, entran en contacto con tioglucosidasas específicas, denominadas mirosinasas, que rápidamente catalizan la hidrólisis de los glucosinolatos a nitrilos, epitionitrilos, tiocianatos e isotiocianatos (Wittstock et al., 2003; Bednarek et al., 2009). Todos estos productos presentan algún grado de toxicidad o actúan como repelentes de muchos insectos herbívoros. Los glucosinolatos y las mirosinasas se encuentran en compartimentos celulares

distribuidos por todos los órganos vegetales, incluyendo hojas, raíces, flores, frutos y semillas.

En el ecotipo Col-0, los glucosinolatos foliares más abundantes son el 4MSOB (4-metilsulfinilbutilglucosinolato o glucorafanina, un glucosinolato alifático), y los glucosinolatos indólicos I3M (indol-3-ilmetil o glucobrasicina) y 1MOI3M (1-metoxindol-3ilmetil o 1-metoxiglucobrasicina) (Brown et al., 2003; Mewis et al., 2005; Schlaeppi y Mauch, 2010).

Los glucosinolatos se encuentran en la planta en niveles constitutivos, pero también son inducibles por diversos tipos de estrés biótico. Se han reportado incrementos en glucosinolatos indólicos luego de eventos de daño mecánico, ataque de insectos y tratamientos con JA (Kliebenstein et al., 2002a; Mewis et al., 2006). Mientras que la inducción de glucosinolatos indólicos es una respuesta característica al tratamiento con JA, son menos los estudios que han reportado incrementos en los niveles de glucosinolatos alifáticos luego del ataque de insectos o de la aplicación exógena de JA (Alvarez et al., 2008; Beekwilder et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes indican que los glucosinolatos alifáticos son importantes en la defensa contra herbívoros y junto con los indólicos actuarían de forma diferencial de acuerdo al tipo de estrés biótico, proporcionando plasticidad a la planta para montar la respuesta de defensa frente a diversos gremios de herbívoros (Mewis et al., 2005; Mewis et al., 2006; Hopkins et al., 2008).

Los glucosinolatos indólicos por su parte, han sido relacionados con la resistencia a patógenos y se ha demostrado que juegan un rol importante en la respuesta de defensa, ya que mutantes deficientes en su síntesis o en su metabolismo son más sensibles al ataque de *Phytophthora brassicae* (Schlaeppi y Mauch, 2010) y *Botrytis cinerea* (Kliebenstein et al., 2005; Łażniewska et al., 2010; Demkura y Ballaré, 2012). Estos compuestos son sintetizados a partir del triptófano, y forman parte de una vía metabólica que posee una regulación extremadamente compleja, ya que a partir del triptófano se sintetizan otros metabolitos indólicos sumamente importantes para la planta, como las auxinas y la fitoalexina camalexina (Bender y Celenza, 2009).

En *A. thaliana*, la síntesis de glucosinolatos indólicos comienza a partir del triptófano (Figura 5), el cual es convertido en indol-3-acetaldoxima (IAOx) por la acción de

las citocromo oxidasas CYP79B2 y CYP79B3 (Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002; Mikkelsen et al., 2003).

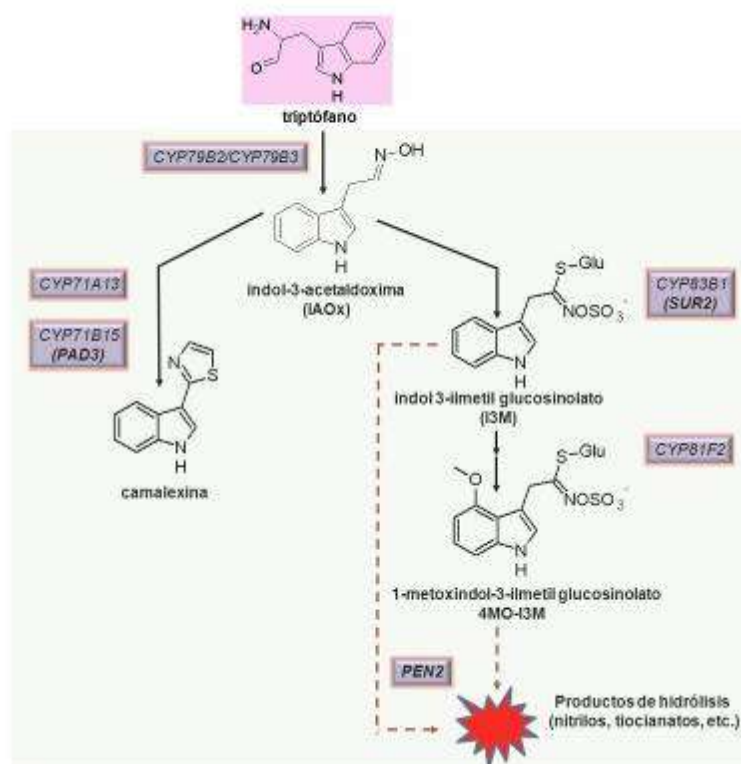


Figura 5: Esquema simplificado de la síntesis de glucosinolatos indólicos y camalexina en *A. thaliana* (Schlaeppe et al., 2010). Los genes de las principales enzimas involucradas se detallan en los recuadros.

La IAOx es el intermediario común en la síntesis de glucosinolatos indólicos, auxinas y camalexina (Mikkelsen et al., 2000; Celenza et al., 2005). La IAOx que es derivada hacia la síntesis de glucosinolatos es utilizada para la síntesis de I3M a partir del cual se deriva la síntesis del resto de los glucosinolatos indólicos (Gigolashvili et al., 2007). El paso limitante en la síntesis de I3M es catalizado por la enzima citocromo oxidasa CYP83B1 (Bak et al., 2001), que en *A. thaliana* está codificada por el gen *SUR2* (del inglés *superroot2*) (Barlier et al., 2000). *CYP8B1/SUR2* es un gen cuya expresión es inducible por la aplicación exógena de JA (Liu et al., 2010), al igual que *CYP79B2* y *CYP79B3*, lo que los hace interesantes como marcadores de expresión génica de respuestas inducidas por JAs.

Camalexina

La IAOx que es derivada hacia la síntesis de camalexina es utilizada como sustrato por la enzima CYP71A13 y la enzima CYP71B15 (codificada por el gen *PAD3* en *A. thaliana*, del inglés *phytoalexin deficient 3*, Figura 5). La enzima CYP71B15 (*PAD3*) interviene en el paso final de biosíntesis de camalexina (Schuhegger et al., 2006) y el gen que la codifica no es inducible por la aplicación de JAs. En cambio, *PAD3* se induce fuertemente frente a la infección de necrótrofos como *B. cinerea* o la aplicación exógena de elicitores microbianos (Ferrari et al., 2007). Aunque la expresión de *PAD3* no es inducible por la aplicación exógena de JAs, la inducción por patógenos es menor en mutantes afectadas en la producción o señalización de jasmonatos (Rowe et al., 2010) lo que indica que los jasmonatos son importantes para la producción de camalexina en respuesta a la infección por hongos necrótrofos. Se ha demostrado que la camalexina se acumula localmente en hojas y en raíces luego de la infección (Kliebenstein et al., 2005; Mewis et al., 2005; Schuhegger et al., 2006), y que juega un rol importante frente al ataque de patógenos como *B. cinerea*, ya que mutantes afectadas en la producción de esta fitoalexina son más sensibles al ataque del hongo (Kliebenstein et al., 2005; Demkura y Ballaré, 2012).

La percepción de la radiación UV-B en *A. thaliana*

Como se mencionó en la introducción general, *A. thaliana* es la primera especie en la que se ha identificado y descrito un fotorreceptor para la radiación UV-B. Si bien la primera información sobre la proteína UVR8 data del año 2002 (Kliebenstein et al., 2002b), hasta el año 2011 no se habían reunido evidencias suficientes de su rol como fotorreceptor (Rizzini et al., 2011)

El mecanismo de acción del receptor UVR8 es un poco diferente al de otros receptores conocidos, ya que en ausencia de luz UV-B conforma dímeros y se monomeriza al absorber la radiación UV-B, en un proceso que involucra la interacción con COP1, una ubiquitina ligasa tipo E3 (Rizzini et al., 2011), la cual es necesaria para la activación de genes inducida por UV-B en plántulas (Oravecz et al., 2006). Muchos de los efectos de UVR8 relacionados con respuestas fotomorfogénicas (como la regulación de genes involucrados en el metabolismo de flavonoides) requieren de la activación de los factores de transcripción HY5 (del inglés *hypocotyle elongated 5*) y HYH (del inglés *HY5 homolog*) (Ulm et al., 2004; Brown et al., 2005; Brown and Jenkins, 2008). Sin embargo, se

han observado respuestas dependientes de UVR8 que no requieren de la activación de HY5 (Fehér et al., 2011) e incluso respuestas al UV-B que parecen ser independientes de UVR8 (Brown and Jenkins, 2008; González Besteiro et al., 2011).

Cabe destacar que ninguno de los efectos de la radiación UV-B sobre la resistencia de plantas a herbívoros y patógenos ha sido aún relacionado con respuestas mediadas por UVR8 (Ballaré, 2011). Algunos autores proponen que los efectos del UV-B sobre las defensas podrían ser consecuencia de efectos pleiotrópicos relacionados al daño celular y a la activación de respuestas generales de estrés que no son exclusivas de la respuesta a la radiación UV-B (Brown and Jenkins, 2008; González Besteiro et al., 2011). Sin embargo es necesario destacar que, las respuestas reportadas hasta el momento en ensayos realizados en condiciones de campo, son inducidas por niveles de irradiancia de UV-B relativamente bajos y que no causan síntomas visibles de estrés o de daño foliar.

Objetivos generales del capítulo

En base a lo expuesto en la introducción y los resultados obtenidos con *N. attenuata*, los objetivos generales de este capítulo son:

Analizar si existe un efecto del UV-B sobre la producción de defensas en *A. thaliana*.

Estudiar si el UV-B modula la respuesta a JAs potenciando la respuesta inducida por los JAs.

Evaluar si el fotorreceptor UVR8 interviene en el incremento de la respuesta de defensa producida por la exposición a radiación UV-B

Materiales y métodos particulares de este capítulo

Material vegetal y condiciones de cultivo

Líneas utilizadas

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* de los ecotipos Columbia (Col-0) y Landsberg erecta (*Ler-0*) obtenidas del ABRC, (www.arabidopsis.org). Además de los ecotipos salvajes se utilizaron las siguientes líneas mutantes del ABRC: las mutantes deficientes en fenólicos *fah1-7*(CS8604), *tt4-1*(CS85), y una línea deficiente en vía de señalización del jasmónico, *jar1-1*(CS8072). Las mutantes *pad3-1*, *pen2-1* y la doble mutante *pad3-pen2*, deficientes en la síntesis y metabolismo de diversos compuestos indólicos de defensa fueron obtenidas gracias al Dr. Paul Schulze-Lefert, (Instituto Max Planck de Colonia, Alemania). Se utilizó además una línea transgénica, P35S:JAZ10.4, sobreexpresante del represor JAZ10.4 (obtenida gracias al Dr. Gregg Howe, Universidad del estado de Michigan, USA).

Germinación de semillas de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* utilizadas fueron esterilizadas durante 8-12 horas con cloro gaseoso antes de ser sometidas al protocolo de germinación. Una vez esterilizadas, se colocaron en placas de Petri con agar Murashige-Skoog (MS) al 0,5 % m/V (Moreno et al., 2009) y se incubaron en oscuridad a 4°C durante 72 h. Una vez finalizado el tratamiento de frío, las semillas fueron sometidas a un pulso de luz roja durante 15 minutos para inducir y sincronizar la germinación. Al cabo de este tratamiento las semillas se germinaron en cámara de cultivo a 22-25°C de temperatura y con fotoperíodo de 10/14h luz/oscuridad.

Cultivo de plantas

Luego de la germinación las plántulas se cultivaron en invernáculo en condiciones de día largo (desde abril hasta agosto-septiembre) durante tres semanas en macetas individuales (0.21L) con una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1). Las plantas fueron regadas cada dos días con una solución de Hakaphos Rojo (18-18-18, Compo).

Tratamientos lumínicos

Para los tratamientos de UV-B, las plantas se colocaron en el mismo dispositivo experimental utilizado en los experimentos de *N. attenuata* (Figura 6), bajo lámparas de emisión de UV-B fluorescentes (UVB TL100W/01 Phillips).



Figura 6: Arreglo de lámparas para el tratamiento de radiación UV-B en el invernáculo.

En los tratamientos de exclusión de UV-B (tratamientos control), la exclusión de la radiación UV-B se realizó cubriendo la mitad del dispositivo bajo las lámparas con filtros de poliéster de entre 100 y 150 μ m (Mylar-D; Du Pont, Oeste Aislantes). En el tratamiento de UV-B el filtro de poliéster fue remplazado por un film transparente al UV de polietileno (Rolopac Argentina, 20 μ m). Las plantas fueron irradiadas durante 4h diarias, con el período de irradiación centrado en el mediodía solar. Los tratamientos de irradiación tuvieron una duración de cuatro días, con una radiación biológicamente efectiva de 5.5 kJm⁻² (calculado utilizando el espectro normalizado a 300nm de Caldwell(1971)). Las plantas fueron asignadas a cada tratamiento al azar y rotadas cada dos días para evitar efectos posicionales de las lámparas.

Tratamientos con metil jasmonato

Ensayos de expresión de genes de defensa en respuesta a UV-B y distintas dosis de MeJA

Para las curvas de dosis-respuesta de expresión génica, las plantas sometidas a los tratamientos de UV-B fueron rociadas con dosis de MeJA (Metil jasmonato, Sigma

Aldrich): 50µM 450µM. Las soluciones de MeJA fueron preparadas disolviendo previamente el MeJA en etanol absoluto (4‰ v/v concentración final de etanol). Las plantas del tratamiento control fueron rociadas con una solución de etanol absoluto al 4‰ v/v.

Inducción de la expresión de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios e inducción de metabolitos secundarios de defensa

Para los ensayos de inducción de metabolitos de defensa y de genes involucrados en su síntesis se eligió una dosis intermedia del rango utilizado para los ensayos de dosis-respuesta. Rosetas de 4 semanas de edad fueron sometidas a los tratamientos de UV-B durante 4 días y luego rociadas con una solución de MeJA 200µM (4‰ v/v concentración final de etanol). Las plantas del tratamiento control fueron rociadas con una solución de etanol absoluto al 4‰ v/v. Para la cuantificación de la expresión génica, las plantas fueron cosechadas a las 3h de la aplicación de MeJA y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la cuantificación de metabolitos de defensa, las plantas fueron cosechadas a las 48h (glucosinolatos) y 72h (compuestos fenólicos) de la aplicación de MeJA y luego liofilizadas.

Bioensayos

Bioensayos con larvas de *S. frugiperda*

Para los bioensayos de desarrollo de larvas, las plantas fueron expuestas a los tratamientos de UV-B previamente descritos. Al cabo de los cuatro días de tratamiento, se colocó sobre cada planta entre seis y ocho larvas recién eclosionadas de *S. frugiperda* (de no más de cuatro días de edad). La parte aérea de las plantas fue confinada dentro de contenedores transparentes cerrados en la parte superior con una malla de nylon. Las plantas fueron mantenidas en el mismo lugar donde fueron irradiadas pero con las lámparas apagadas para evitar efectos directos del UV-B sobre las larvas. El peso de las larvas fue registrado a las 72h y a los seis días del confinamiento con las plantas.

Bioensayos con *B. cinerea*

Para determinar el efecto del UV-B sobre la susceptibilidad a *B. cinerea* se realizaron bioensayos infectando las plantas con suspensiones de conidios de *B. cinerea*.

Los cultivos de *B. cinerea* se mantuvieron en placas de agar papa glucosado (1,5% m/m agar, 2% m/m de extracto de papa liofilizado, 2% m/m glucosa) en una cámara de cultivo a 25-30°C. Previo al bioensayo se seleccionaron placas donde se observaban fructificaciones de conidios. Los conidios se colectaron con agua destilada por medio del raspado de las placas con una varilla de vidrio, se filtraron y resuspendieron en una solución de sacarosa 100mM/KH₂PO₄ 70mM para inducir la germinación (Elad, 1991). El recuento de conidios se realizó en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico y la concentración de conidios se ajustó a un valor aproximado de 5×10^5 conidios/ml.

Para la realización de los bioensayos, se utilizaron rosetas de cuatro semanas que fueron expuestas a los distintos tratamientos de UV-B durante cuatro días. Luego del tratamiento lumínico, cinco hojas completamente expandidas de cada roseta fueron inoculadas en la superficie adaxial con una gota de 5µL de la suspensión de conidios. Las plantas infectadas fueron confinadas en cámaras húmedas de poliéster transparente para facilitar la infección (Figura 7).



Figura 7: Cámaras húmedas utilizadas para los bioensayos con *B. cinerea* (izquierda). Detalle de una planta infectada en la que se ven las lesiones de necrosis en las hojas (derecha).

Las hojas inoculadas fueron cosechadas 48h después de la inoculación, fijadas con cinta adhesiva transparente y escaneadas con un scan HP Scanjet 4500c (Hewlett-Packard). El área de las lesiones producidas en las hojas por *B. cinerea* se cuantificó usando un programa de diseño de imágenes (Adobe Photoshop7.0, Adobe Systems).

Cuantificación de metabolitos secundarios

Fenólicos

Para monitorear la acumulación de fenólicos foliares se utilizó la técnica de cuantificación de fluorescencia de la clorofila citada en el capítulo anterior.

Los fenólicos foliares individuales se cuantificaron por HPLC. La extracción se realizó sobre tejido foliar liofilizado siguiendo un protocolo similar al descrito para *N. attenuata*. La separación cromatográfica se realizó con el mismo equipamiento pero con modificaciones en el perfil de elución para adecuar la separación de los compuestos fenólicos de *A. thaliana*. La composición del gradiente fue la siguiente: Solvente A (H_3PO_4 0,25% en agua MilliQ), solvente B (acetonitrilo), gradiente de elución: 5% B (minuto 0), 50% B (22 min), 5% B (25 min) con un tiempo de equilibrado de la columna de 10 min y un flujo de fase móvil de 1ml/min. El volumen de inyección fue de 20µL y la elución fue monitoreada con un detector de arreglo de diodos a 230, 305 y 320nm. Los fenólicos foliares mayoritarios de *A. thaliana*, sinapoil malato, glicósidos de quercetina y de kaempferol, fueron identificados comparando sus espectros UV-Vis y sus tiempos de retención relativos con datos previamente publicados (Besseau et al., 2007), ver Apéndice para los cromatogramas).

Cuantificación de glucosinolatos

Los glucosinolatos foliares se extrajeron y cuantificaron a partir de tejido foliar liofilizado, siguiendo una técnica modificada a partir del protocolo reportado por (Brown et al., 2003) . Por muestra se pesaron alrededor de 15mg de tejido liofilizado molido en mortero. Las muestras fueron resuspendidas en 1,2mL de metanol 70% v/v junto con 0,125µmoles de sinigrina (2-propenylglucosinolato, Sigma Aldrich) como estándar interno. Posteriormente se incubaron durante 1min a 70°C en un baño de agua y se centrifugaron a 12.000 rpm y 4°C durante 2 min. El sobrenadante se separó y sobre el precipitado se repitió dos veces el proceso de extracción, incubación y centrifugación con metanol 70%. Los tres sobrenadantes fueron combinados y transferidos a micro columnas de 1mL empaquetadas con 600µL (alrededor de 75mg) de la resina de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A-25 (GE Healthcare). La resina de las columnas previamente se equilibró con 800µL de agua MilliQ. Una vez pasados los sobrenadantes, las columnas se lavaron secuencialmente con

600µL de metanol 70% v/v y 600µL de agua MilliQ. Los glucosinolatos retenidos en la columna fueron desulfatados por incubación en columna con 25µL de solución de la enzima Arylsulfatasa (Arylsulfatasa H1 de *Helix pomatia*, Sigma Aldrich) preparada según (Brown et al., 2003) junto con 600µL de solución reguladora de acetato de sodio 20mM, pH 4,0. Las columnas tapadas fueron incubadas durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de la incubación los desulfoglucosinolatos resultantes fueron eluidos con 600 µL de agua MilliQ.

Los desulfoglucosinolatos fueron analizados por HPLC (KnauerEuroline), utilizando una columna de C18 Restek, Pinnacle II (5,0µm, 4,6 x 150mm). La elución se realizó mediante un perfil de gradiente con la siguiente composición: solvente A (agua), solvente B (acetonitrilo 20% v/v), 1 % B (min 0), 10% B (10min), 75% B (22-24min), con un tiempo de equilibrado de columna de 10 min y un flujo de fase móvil de 1ml/min. El volumen de inyección fue de 20µL, y la elución se monitoreó con un detector de arreglo de diodos a 229nm. Los glucosinolatos foliares mayoritarios del ecotipo Col-0, 4-metilsulfinilbutil (4MSOB) e indolil-3-metil (I3M), se identificaron en base a sus tiempos de retención relativos al estándar interno y su espectro UV-Vis. Para calcular las concentraciones molares, se utilizaron las áreas de cada glucosinolato, el área del estándar interno y los factores de respuesta relativos publicados por Brown et al. (2003).

Expresión génica

Para la cuantificación de la expresión génica se utilizó el mismo protocolo de extracción de ARN del capítulo anterior. Las fracciones de ARN purificadas fueron tratadas con DNAsa en las condiciones anteriormente descriptas y utilizadas para la síntesis de ADNc por PCR reversa. El ADNc obtenido se diluyó 1:10 y se utilizó para cuantificar la expresión de genes por PCR en Tiempo Real, en un equipo 7500 Real Time PCR System (AppliedBiosystems). Para la cuantificación se utilizó el kit FastStart Universal SYBR GreenMaster Mix (Roche AppliedScience) y primers a una concentración final de 500nM. Para normalizar las diferencias de concentración entre muestras se cuantificó la expresión del gen de *A. thaliana* UBIQUITINA (UBC). Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 1.

| Gen | Primer Forward (5'→3') | Primer Reverse (5'→3') |
|----------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>UBC</i> | CTGCGACTCAGGGAATCTTCTA | TTGTGCCATTGAATTGAACCC |
| <i>JAZ10</i> | TCAGCCTCAGATCCCGATT | CTAGACCTGGCGAGAGACGC |
| <i>MYC2</i> | CCGAAAACCCGAATCTGGAT | GGGTCTGAGAATGAACCGGAC |
| <i>ERF1</i> | CCTCGGCGATTCTCAATTTTT | CCGAAAGCGACTCTTGAACCTCT |
| <i>VSP1</i> | GGGCGTACTGGTCGTGGTTA | CCGGGAGTCCTGGAGTTGAT |
| <i>PDF1.2</i> | TTGCTGCTTTCGACGCA | TGTCCCACTTGGCTTCTCG |
| <i>CYP83B1</i> | TCACGCCATATCTACCAGC | TGGACGTCATGACTGGAC |
| <i>PAD3</i> | TCCCCAAGTGTGTCCGAATCTCGT | GGATTGGTGGAGTCGCTGGCA |

Tabla 1: Secuencias de los primers utilizados para cuantificar la expresión génica. La denominación de los primers se encuentra relacionada a la denominación registrada en el TAIR (www.arabidopsis.org) para el gen de interés. *UBC*, *UBIQUITIN CONJUGATIN ENZYME 1*; *JAZ10*, *JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10*; *MYC2/JIN1*, *JASMONATE INSENSITIVE 1*; *ERF1*, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*; *VSP1*, *VESICLE STORAGE PROTEIN 1*; *PDF1.2*, *PLANT DEFENSIN 1.2*; *CYP83B1*, *CYTOCHROME P450, FAMILY 83, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 1*; *PAD3*, *PHYTOALEXIN DEFICIENT 3*

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software INFOSTAT (Versión profesional 1.1). Los bioensayos fueron analizados por medio de un ANOVA de dos factores con el genotipo y el tratamiento de UV-B como factores. En casos donde los genotipos mutantes utilizados diferían en el fondo genético (*Ler-0* o *Col-0*) los grupos de mutantes se analizaron por separado junto con su respectivo genotipo salvaje. Los datos de metabolitos secundarios se analizaron mediante un ANOVA de dos factores con el tratamiento de UV-B y el de aplicación de MeJA como factores. Cuando la interacción entre factores resultó significativa, la diferencia entre medias se evaluó mediante el test de comparaciones de Tukey. Las transformaciones realizadas a los datos para cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad se indican en cada gráfico.

Resultados

La exposición a radiación UV-B en dosis ecológicamente representativas reduce el desarrollo de larvas de *S. frugiperda* por mecanismos que no involucran la percepción mediada por UVR8

En el capítulo anterior se mostró que en condiciones de campo, las plantas de *N. attenuata* expuestas a la radiación UV-B ambiental sufren menores niveles de herbivoría causada por thrips que las plantas de tratamientos donde el UV-B ambiental ha sido atenuado y que además este efecto involucra la vía de los JAs, ya que el efecto del UV-B sobre la herbivoría no se observó en plantas de la línea *as-lox*.

Con el objetivo de determinar si en *A. thaliana* la exposición al UV-B también produce efectos negativos sobre la herbivoría, se realizaron bioensayos con larvas recién eclosionadas de *S. frugiperda*. *Spodoptera* es un género de insectos lepidópteros que ya han sido frecuentemente utilizado en bioensayos con *A. thaliana* (Cipollini et al., 2004; Johnson y Dowd, 2004; Moreno et al., 2009). Para la realización de los bioensayos se utilizaron plantas del ecotipo Col-0. Se incluyeron además plantas de la mutante *uvr8-6* que carece del receptor involucrado en la percepción de la radiación UV-B, para determinar si el efecto del UV-B sobre la herbivoría en *A. thaliana* depende de la percepción de la luz por el fotorreceptor UVR8.

El incremento en biomasa de las larvas fue significativamente menor en las plantas que fueron expuestas al UV-B (Figura 8).

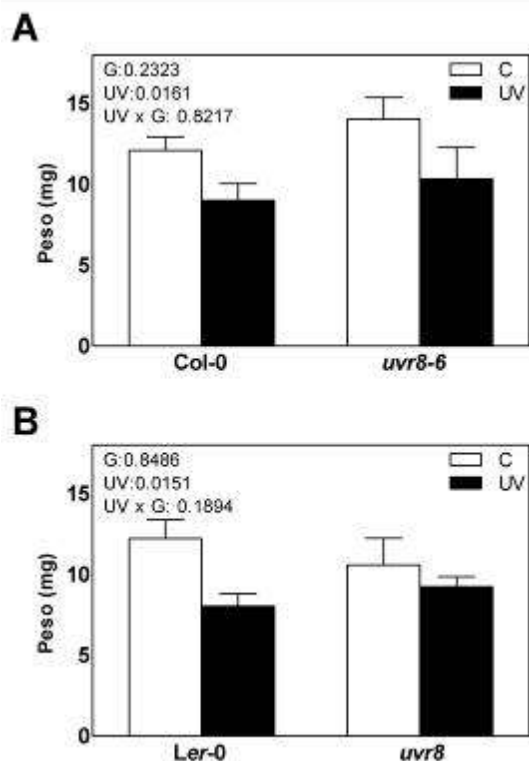


Figura 8: Efecto de la exposición de plantas de *A. thaliana* a la radiación UV-B sobre el crecimiento de larvas de *S. frugiperda*. Los bioensayos se realizaron con plantas del ecotipo Col-0 (A) y *Ler*-0 (B) y con las mutantes *uvr8* obtenidas en los ecotipos correspondientes. C, plantas del tratamiento con luz ambiente; UV, plantas del tratamiento de luz ambiente suplementada con luz UV-B. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 8). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo. Los datos correspondientes al ecotipo *Ler* fueron transformados con la función logaritmo para cumplir los supuestos del análisis de varianza.

El efecto negativo sobre el desarrollo de las larvas en las plantas expuestas al UV-B fue observado aun en el genotipo *uvr8-6* (Figura 8-A), indicando que el incremento de la resistencia contra *Spodoptera* producido por la exposición a la radiación UV-B no involucraría una vía de señalización dependiente de UVR8. Se observó el mismo patrón de respuesta en el desarrollo de larvas cuando los bioensayos fueron realizados con plantas del ecotipo *Ler*-0 y la mutante *uvr8* obtenida en el mismo fondo genético (Figura 8-B). Estos resultados en principio parecen contradictorios, ya que sería de esperar que si el UV-B produce cambios en la calidad del tejido vegetal estos cambios sean consecuencia de una respuesta que involucre la percepción del UV-B por algún mecanismo de señalización regulado. Sin embargo, existen evidencias de que algunas respuestas al UV-B son reguladas

por mecanismos independientes de la percepción mediada por UVR8 (Jenkins, 2009; González Besteiro et al., 2011) y los resultados observados en este experimento podrían explicarse por estos procesos. Otra de las posibilidades es que el tratamiento de UV-B haya provocado una inhibición de crecimiento en las plantas expuestas y que como consecuencia el tejido vegetal fuese un limitante para las larvas mantenidas sobre plantas del tratamiento de UV. Sin embargo, las dosis de UV-B aplicadas en todos los experimentos realizados fueron comparables a las del ambiente natural y solo se observó una muy leve restricción de crecimiento en plantas del ecotipo Col-0, mientras que no se observó inhibición de crecimiento en las rosetas de *uvr86* (Figura 9-A).

La exposición a dosis de UV-B similares a las ambientales reduce el desarrollo de la infección por *Botrytis cinerea*. El aumento en la resistencia depende de mecanismos que involucran la percepción de la radiación UV-B por UVR8

Como el objetivo general de este trabajo era determinar el efecto de la exposición a UV-B sobre los mecanismos de defensa dependientes de JAs y su relación con el fotorreceptor de UV-B, se decidió utilizar otros organismos para los que la respuesta de defensa de *A. thaliana* dependa de la vía de JAs. Con este fin, se realizaron bioensayos con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Para la realización de los primeros bioensayos se utilizaron plantas del ecotipo Col-0 y la mutante *uvr8-6*. El desarrollo de las lesiones producidas por el avance de la infección de *B. cinerea* fue significativamente menor en las plantas expuestas al UV-B (Figura 9-B).

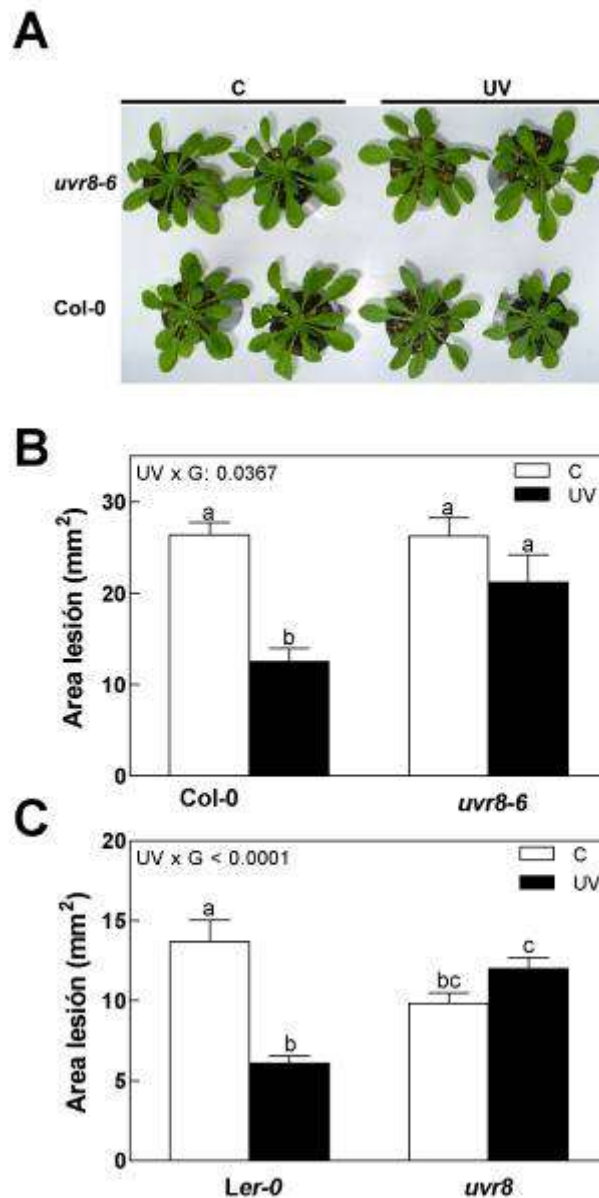


Figura 9: La exposición al UV-B incrementa la resistencia de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea* en el ecotipo Col-0, pero no en la mutante *uvr8-6*. El tratamiento de UV-B utilizado no produjo signos evidentes de daño foliar o inhibición del crecimiento (A). B) La exposición a la radiación UV-B redujo los síntomas de infección en el ecotipo Col-0 pero no en la mutante *uvr8-6*. Se observó el mismo patrón de respuesta al realizar el experimento con plantas del ecotipo *Ler-0* y la mutante *uvr8* correspondiente (C). El área de las lesiones fue medida a las 48h de la infección, los valores representan la media de cada tratamiento individual +ES (n=8). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo.

A diferencia de lo observado en los bioensayos con *S. frugiperda*, el efecto del UV-B aumentando la resistencia a *B. cinerea* no se observó en las mutantes *uvr8-6*, indicando que el UV-B produce cambios en los tejidos de *A. thaliana* que afectan el desarrollo de la respuesta de defensa contra *B. cinerea* y que estos cambios dependen de la percepción del UV-B por el receptor UVR8. Este aumento en la resistencia producido por el UV-B no depende de cambios en el tamaño de las plantas, ya que al igual que durante los ensayos con *S. frugiperda* la exposición de las plantas a los tratamientos de UV-B no produjo cambios significativos en el crecimiento de las rosetas (Figura 9-A). El mismo patrón de respuesta fue observado en un bioensayo realizado con plantas del ecotipo *Ler-0* y la mutante *uvr8* del mismo fondo genético (Figura 9-C).

A continuación se realizaron experimentos para determinar los cambios que produce la exposición a la radiación UV-B en la inducción de defensas dependientes de JAs en *A. thaliana* a nivel de cambios en la expresión génica.

El efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia de *A. thaliana* a *B. cinerea* no implica incrementos en la expresión de genes de defensa ni cambios en los niveles de reguladores de la vía de JA

En los ensayos presentados en el capítulo anterior, se demostró que dosis de UV-B similares a las del ambiente natural no son capaces de inducir la producción de JAs. Sin embargo, la expresión del gen del inhibidor de proteinasas insectiles (*TPI*) en respuesta a la aplicación exógena de MeJA fue mayor en las plantas expuestas al UV-B. Esto sugiere que si bien la radiación UV-B en niveles ambientales no tiene la capacidad de inducir la producción de defensas podría potenciar las respuestas inducibles de la vía de JAs, aumentando la sensibilidad de los tejidos a la hormona o sus derivados bioactivos por mecanismos aún desconocidos. Una hipótesis posible para explicar el cambio en sensibilidad es que la exposición a la radiación UV-B afecte la inducción por herbívoros de reguladores y represores de la respuesta de defensa.

Dado que en *A. thaliana* se conocen en mayor detalle los reguladores, factores de transcripción y genes de respuesta involucrados en la vía de JAs, se realizó un ensayo de tipo dosis-respuesta con diseño similar al realizado con *N. attenuata* para determinar si el

incremento en la sensibilidad al MeJA en plantas expuestas al UV-B involucra a alguno de los elementos reguladores de la vía de transducción de señales.

Rosetas del ecotipo Col-0 de cuatro semanas de edad fueron expuestas a radiación UV-B en el invernáculo en las condiciones que se detallan en la sección de materiales y métodos. Al cabo de cuatro días de exposición, las plantas fueron separadas en tres grupos que fueron rociados con dosis de 50 μ M y 450 μ M de MeJA, mientras que el grupo control (dosis 0 μ M) fue rociado con una solución de etanol absoluto al 4% (v/v). El tejido se cosechó luego de las tres horas de la aplicación exógena de MeJA. A partir del ARN total extraído del tejido vegetal se cuantificó la expresión de genes involucrados en la respuesta de JAs: el represor *JAZ10*, los factores de transcripción *ERF1*, y *MYC2*, las proteínas de defensa *VSP1*, y *PDF1.2* y la enzima *CYP83B1/SUR2* involucrada en la biosíntesis de glucosinolatos indólicos (Figura 10).

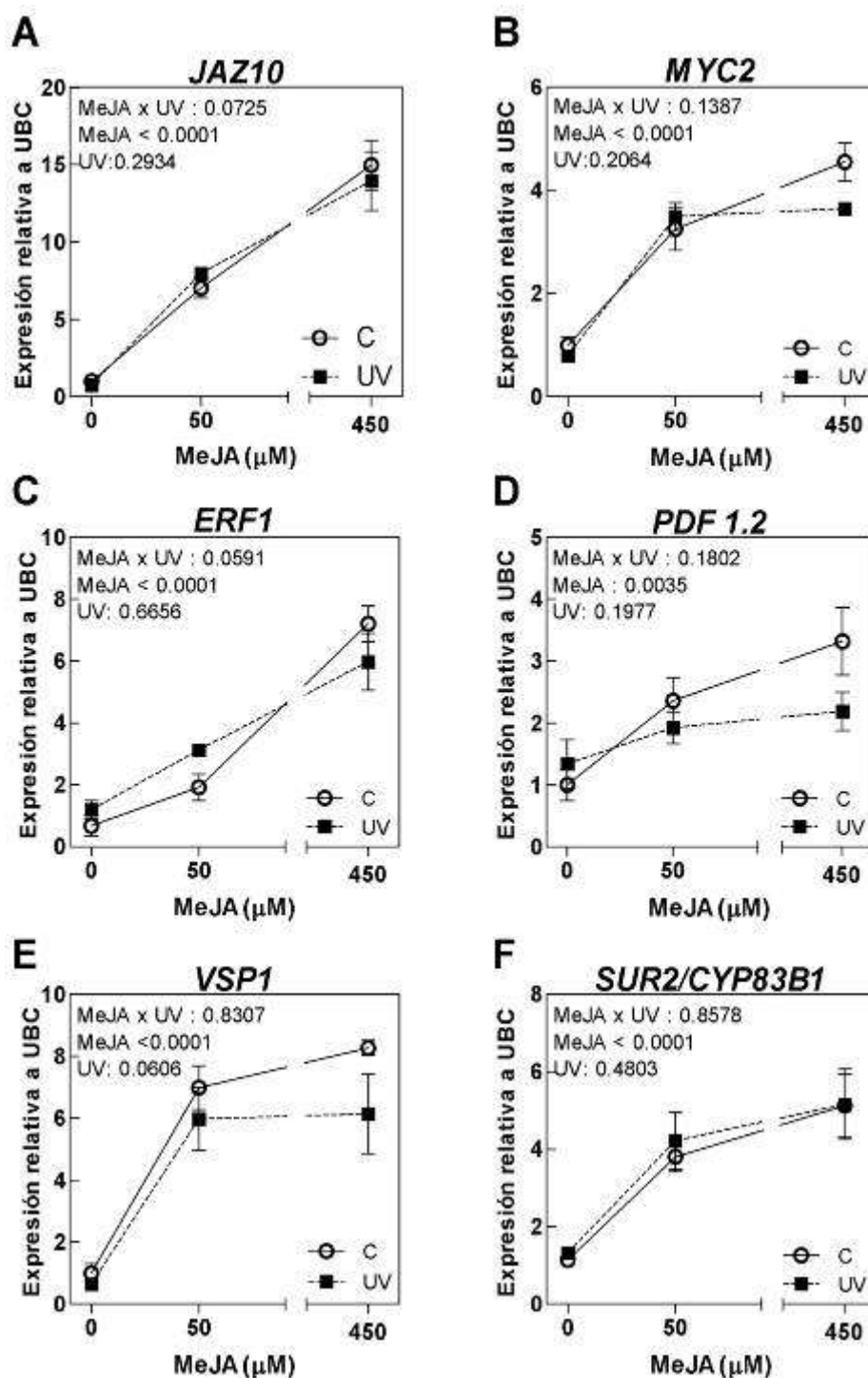


Figura 10: Efectos de la exposición a la radiación UV-B y la aplicación de MeJA sobre la expresión génica. Las plantas fueron cosechadas a las 3h de la aplicación exógena de MeJA. Cada punto de la curva representa la media del tratamiento \pm ES (n= 3, cada réplica biológica es un conjunto de tres plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; MeJA, efecto de la aplicación exógena de metil jasmonato. Los

datos de la expresión de *SUR2* fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

La aplicación exógena de MeJA indujo la expresión del gen que codifica para el represor JAZ10, así como también la de factores de transcripción y proteínas de respuesta que se encuentran río abajo en la cadena de transducción de señales de JA. Los niveles de expresión de los genes analizados se incrementaron de manera dependiente de la dosis de MeJA aplicada, como era de esperarse. Sin embargo, ninguno de estos genes presentó inducción significativa por exposición a la radiación UV-B. A diferencia de lo observado en *N. attenuata* para el gen *TPI*, no se observaron incrementos significativos en la respuesta a MeJA en las plantas expuestas al UV-B; incluso en el caso de los genes *MYC2*, *VSP1* y *PDF1.2* se observó una tendencia a una reducción en la sensibilidad al MeJA en plantas expuestas.

Ensayos previos realizados con *A. thaliana* demostraron que la exposición a UV-B fue capaz de inducir la expresión de *MYB51*, un gen que codifica para un factor de transcripción involucrado en la regulación de la síntesis de glucosinolatos indólicos (Kilian et al., 2007). En el mismo conjunto de datos (disponibles en <http://bar.utoronto.ca/efp>), se observa un incremento en la expresión de *CYP83B1* en las tres horas posteriores a la aplicación del tratamiento lumínico. En estos ensayos el tratamiento de UV-B consistió en la aplicación de un tratamiento corto de 15 minutos, mientras que los tratamientos lumínicos utilizados en los experimentos de esta tesis consistieron en exposiciones más prolongadas, durante las cuales las plantas expuestas tuvieron tiempo de adaptarse a la radiación. Una explicación para lo observado por estos autores podría ser que la exposición al UV-B en *A. thaliana* produzca la inducción de genes de defensa como parte de una respuesta de estrés durante las primeras horas de exposición, y que este fenómeno deje de ser observable una vez que las plantas tuvieron tiempo de adaptarse a la nueva condición lumínica. Si bien el objetivo de esta tesis es evaluar lo que podría ocurrirles a plantas en ambientes naturales, las cuales se encuentran continuamente expuestas a la radiación UV-B, para comprobar si las dosis utilizadas eran capaces de inducir expresión génica sólo en las primeras horas de exposición a la radiación, se realizó un ensayo de dosis-respuesta con diseño similar al anterior, pero donde el tratamiento de UV-B y la aplicación de las dosis de MeJA se realizaron en forma simultánea. Al cabo de las tres horas de aplicados ambos

tratamientos las plantas fueron cosechadas para determinar la expresión del gen *CYP83B1* (Figura 11).

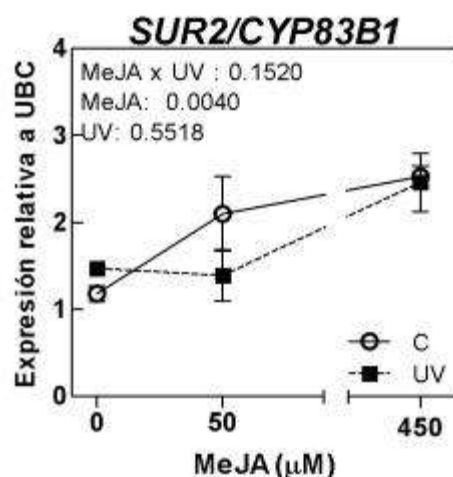


Figura 11: Efectos de la exposición a la radiación UV-B y la aplicación de MeJA en forma simultánea. Las plantas fueron cosechadas a las 3h de la aplicación conjunta del tratamiento de UV-B y el rociado con MeJA. Cada punto de la curva representa la media del tratamiento \pm ES ($n=3$, cada réplica biológica es un conjunto de tres plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; MeJA, efecto de la aplicación exógena de metil jasmonato. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis.

De forma similar a los ensayos anteriores, la expresión de *CYP83B1* se incrementó significativamente en función de la dosis de MeJA aplicada. Sin embargo, a diferencia de lo observado por Killian et al. (2007), el tratamiento simultáneo de UV-B no tuvo efecto significativo sobre la expresión génica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica sugieren que la vía de JA no parece ser afectada por la exposición al UV-B en *A. thaliana*. Para descartar que el efecto de la radiación UV-B sobre la infección por *B. cinerea* involucre a los JAs, se realizaron bioensayos con *B. cinerea* y tratamientos de UV-B como los anteriormente descritos, pero incluyendo esta vez líneas mutantes afectadas en la señalización de la vía del JA: la mutante *jar1-1*, deficiente en la producción de JA-Ile y que por lo tanto presenta mayor sensibilidad a *B. cinerea* (Ferrari et al., 2003), y la línea P35S:JAZ10.4, una línea transgénica sobreexpresante de una variante de *splicing* de la proteína represora JAZ10 (JAZ10.4), que es altamente resistente a la degradación inducida por JA. Esta línea es

insensible por lo tanto a JAs y presenta un fenotipo similar a otras mutantes deficientes en jasmonatos (Chung y Howe, 2009). Como era de esperarse, las plantas de los genotipos *jar1-1* y P35S:JAZ10.4 presentaron mayor sensibilidad a la infección por *B. cinerea*, ya que en estas plantas el desarrollo de la infección fue significativamente mayor (Figura 12). En cuanto a los efectos del tratamiento lumínico, al igual que lo presentado en la Figura 9 el desarrollo de la infección fue menor en las plantas del ecotipo Col-0 expuestas a la radiación UV-B. El efecto del UV-B incrementando la resistencia a la infección por *B. cinerea* en los genotipos deficientes en la señalización de JA fue similar al observado en el genotipo salvaje.

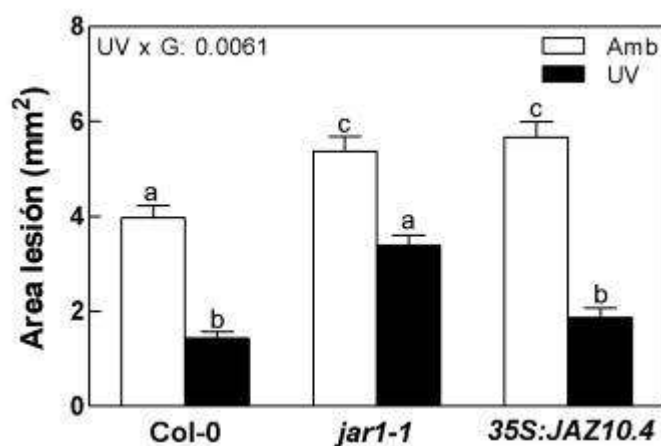


Figura 12: El efecto de la radiación UV-B incrementando la resistencia la infección por *B. cinerea* no requiere de la señalización por JAs. Las áreas de lesión fueron medidas 48h luego de la inoculación. Cada barra representa a media del tratamiento + ES (n = 5-8 plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo.

A continuación se estudiaron los efectos de la exposición a UV-B y la aplicación exógena de MeJA sobre la producción de metabolitos secundarios.

La producción de algunos glucosinolatos se incrementa en respuesta a la aplicación exógena de MeJA, pero no es influenciada por los tratamientos de UV-B.

En *A. thaliana*, así como en el resto de las Brassicaceae y las Capparales en general, los glucosinolatos constituyen la defensa más importante a nivel de metabolitos secundarios. Una de las respuestas más características a la aplicación exógena de MeJA es el incremento en los niveles de glucosinolatos indólicos, principalmente el I3M. En los

experimentos de expresión génica se encontró que la aplicación de MeJA era capaz de inducir la expresión de *CYP83B1* (un gen clave en la vía de síntesis de glucosinatos indólicos) y que esta inducción era dosis-dependiente, sin embargo los niveles de inducción no fueron alterados significativamente por el tratamiento de UV-B.

No obstante, existen evidencias previas (Foggo et al., 2007; Kuhlmann y Müller, 2009) de que la exposición UV-B en ambientes naturales produce incrementos en los niveles de glucosinatos de algunas especies pertenecientes a las Brassicaceae. Por lo tanto, para determinar los efectos de la exposición a UV-B y la aplicación exógena de MeJA sobre la producción de metabolitos secundarios dentro del marco del diseño experimental utilizado para esta tesis, se realizó un experimento en las mismas condiciones que el de expresión génica, con los genotipos Col-0 y *uvr8-6*, para determinar si la exposición a UV-B afecta los niveles de glucosinatos de *A. thaliana*. Las plantas fueron expuestas al mismo tratamiento de radiación UV-B y a los cuatro días se realizó la aplicación exógena de MeJA, en una única dosis intermedia al rango utilizado para los experimentos de expresión génica (200µM). Al cabo de 48hs de la aplicación de MeJA, las rosetas fueron cosechadas y el tejido vegetal fue liofilizado. Los glucosinatos foliares mayoritarios del ecotipo Col-0 4MSOB (glucosinato alifático) e I3M (glucosinato indólico) fueron separados de los extractos totales de tejido por cromatografía de intercambio iónico, desulfatados y finalmente cuantificados por cromatografía líquida (HPLC-DAD, ver sección materiales y métodos).

La aplicación exógena de MeJA indujo fuertemente la acumulación de I3M tanto en el ecotipo Col-0 como en la mutante *uvr8-6* (Figura 13), sin embargo, el tratamiento de UV-B no tuvo efectos significativos en ninguno de los dos genotipos, si bien parece haber una tendencia a incrementar la inducción por MeJA en las plantas Col-0 expuestas al UV-B.

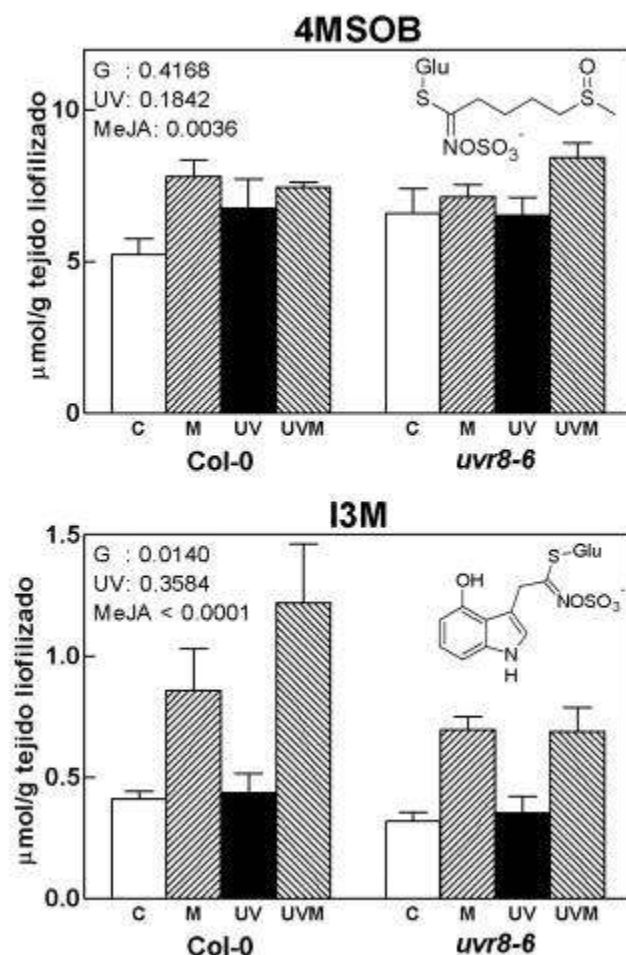


Figura 13: La exposición a la radiación UV-B no altera el contenido de glucosinolatos en plantas de *A. thaliana* ni potencia la inducción por JA. Los glucosinolatos mayoritarios 4MSOB e I3M se determinaron a las 48h de la aplicación de MeJA. C, luz ambiente; M, luz ambiente y aplicación de MeJA, UV luz suplementada con UV-B, UVM, luz ambiente suplementada con radiación UV-B y aplicación exógena de MeJA. Cada barra representa la media del tratamiento + ES (n=4, cada réplica biológica es un conjunto de tres plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo; MeJA, efecto de la aplicación exógena de metil jasmonato. Los datos de I3M fueron transformados con logaritmo para cumplir los supuestos del análisis).

Los niveles de I3M inducidos por la aplicación de MeJA en las plantas *uvr8-6* expuestas al UV-B fueron levemente menores respecto a las plantas Col-0; lo que podría proporcionar una explicación de la menor resistencia de las *uvr8-6* bajo el tratamiento de UV-B del bioensayo de la Figura 9, sin embargo, a pesar de tener niveles menores de I3M, las plantas *uvr8-6* no fueron significativamente más sensibles que las plantas Col-0 en los tratamientos sin UV-B de ese bioensayo.

Otro metabolito indólico de gran importancia en la respuesta de defensa contra *B. cinerea* en *A. thaliana* es la fitoalexina camalexina (Glawischnig, 2007). Los niveles de camalexina se inducen significativamente luego de la infección por *B. cinerea* y otros patógenos y por la aplicación exógena de agentes oxidantes como AgNO_3 (Ferrari et al., 2003; Kliebenstein, 2004; Kliebenstein et al., 2005; Schlaeppli et al., 2010). Una de las consecuencias de la exposición a la radiación UV-B es la generación de especies reactivas del oxígeno, las cuales pueden inducir estrés oxidativo en la planta. Existen trabajos que reportan incrementos en los niveles de camalexina luego de la aplicación de dosis de radiación UV, aunque se trata de experimentos donde el tratamiento lumínico consistió en la exposición a radiación UV de alta energía (UV-C, $\lambda < 280\text{nm}$) o exposiciones muy prolongadas a radiación UV-B, en ambos casos tratamientos que posiblemente generen estrés oxidativo capaz de inducir entre otras cosas la producción de camalexina, pero que no son comparables a las condiciones del ambiente natural (Mert-Turk et al., 2003; Glawischnig, 2007). No fue posible cuantificar los niveles de camalexina en el material vegetal de nuestros experimentos porque no se dispuso del equipamiento necesario para realizar las determinaciones, sin embargo, fue posible cuantificar la expresión de *PAD3*, el gen que codifica para la principal enzima involucrada en la síntesis de camalexina. Este gen se induce en respuesta a las infecciones con *B. cinerea* y las líneas mutantes que carecen de *PAD3* poseen niveles reducidos de camalexina, indicando su importancia en la vía de síntesis. En nuestras condiciones experimentales, la exposición a la radiación UV-B no indujo significativamente los niveles de expresión de *PAD3* (Figura 14), por lo que es de esperar que las plantas expuestas a UV-B no posean mayores niveles de camalexina que las del tratamiento control.

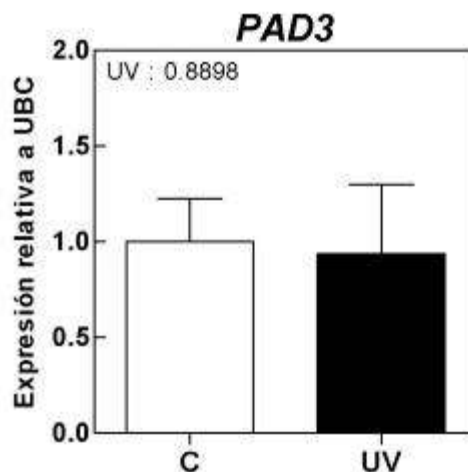


Figura 14: La exposición a la radiación UV-B no incrementa la expresión de *PAD3*, involucrado en la síntesis de camalexina. Cada barra representa la media del tratamiento + ES (n=3, cada réplica biológica es un conjunto de tres plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B.

Para evaluar en mayor profundidad el rol de los glucosinolatos indólicos y de la camalexina en el incremento de la resistencia a *B. cinerea* producido por la radiación UV-B, se realizaron bioensayos utilizando esta vez líneas mutantes deficientes en la síntesis o procesamiento de glucosinolatos indólicos y camalexina. Los experimentos fueron llevados a cabo de la misma manera que los anteriormente descritos, utilizando esta vez plantas de los genotipos Col-0, *pad3-1* (una mutante que no posee niveles detectables de camalexina), *pen2-1* (una línea mutante que no posee la enzima mirosinasa encargada de activar los glucosinolatos indólicos y es por lo tanto más sensible a *B. cinerea*), y la doble mutante *pen2pad3*.

Como era de esperarse, tanto la mutante *pen2-1* como *pad3-1* y la doble mutante *pen2pad3* mostraron una mayor sensibilidad a la infección por *B. cinerea*. Sin embargo, a pesar de ser más sensibles, los tres genotipos mostraron una respuesta similar a la del ecotipo Col-0 en el tratamiento de UV-B, para el cual se observó una mayor resistencia a la infección y desarrollo significativamente menor de las lesiones (Figura 15).

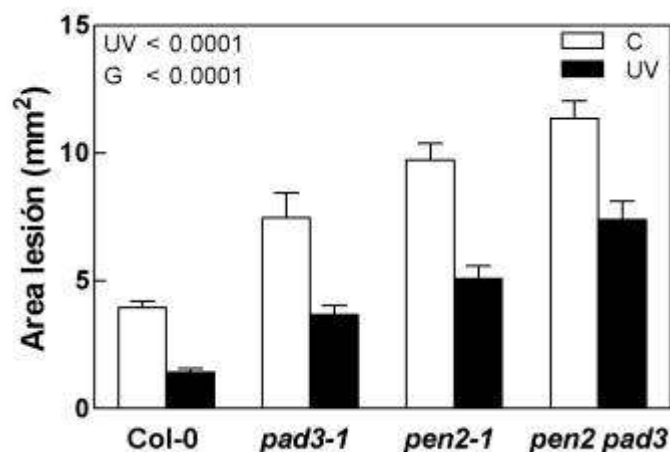


Figura 15: El efecto de la radiación UV-B incrementando la resistencia a *B. cinerea* se conservó en mutantes afectadas en la producción de camalexina y en el procesamiento de glucosinolatos indólicos. Las áreas de lesión se midieron a las 48h de la infección. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 5-8 plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo.

Los resultados demuestran que ni los glucosinolatos ni la camalexina sufren incrementos en las plantas de *A. thaliana* expuestas al UV-B, indicando que el incremento en la resistencia a *B. cinerea* involucra a otros componentes de la respuesta de defensa. Cabe destacar además que estos experimentos constituyen el primer registro de los niveles de glucosinolatos en la mutante *uvr8-6*, ya que hasta el momento solo se había evaluado el papel del fotorreceptor en la producción de compuestos fotoprotectores.

Examinando estos experimentos en conjunto con los de expresión génica en respuesta a la radiación UV-B y la aplicación exógena de jasmonatos, es posible concluir que, a diferencia de lo encontrado en *N. attenuata* el efecto de la radiación UV-B incrementando en *A. thaliana* la resistencia no está mediado por la vía del JA. Los resultados presentados en la Figura 8 con los bioensayos de *S. frugiperda* aportan una evidencia más a los experimentos con *B. cinerea*, indicando que si bien existe un efecto del UV-B, al menos en *A. thaliana* no involucra a las defensas inducibles por JA.

La exposición a la radiación UV-B en *A. thaliana* produce incrementos en compuestos fenólicos y este incremento involucra la regulación por el fotorreceptor UVR8, pero es independiente de la vía de JA.

En el capítulo anterior se mostró que algunos compuestos fenólicos con rol fotoprotector además de ser inducidos por la exposición a UV-B también formaban parte del repertorio de las respuestas inducibles por JAs. Para evaluar los efectos de la radiación UV-B y los JAs sobre la producción de compuestos fenólicos en *A. thaliana*, se realizaron ensayos con un diseño similar a los realizados para la cuantificación de glucosinolatos. Al igual que en estos ensayos, se utilizó una única dosis de MeJA de concentración 200 μ M. Al cabo de 72h del tratamiento de MeJA el tejido vegetal fue cosechado y liofilizado. La diferencia en el tiempo de cosecha respecto a los ensayos de cuantificación de glucosinolatos reside en que el pico máximo de acumulación de estos compuestos se da en tiempos distintos. La determinación de compuestos fenólicos se realizó a partir del tejido liofilizado por cromatografía líquida (HPLC-DAD).

La exposición de las plantas a la radiación UV-B incrementó significativamente los niveles de los flavonoides solubles (Figura 16 B-F; 2 glicósidos de quercetina y 3 glicósidos de kaempferol) así como también los niveles de sinapoil malato (Figura 16-G) y sinapoil glucosa (ver Apéndice), tal como se esperaba. En concordancia con los resultados publicados por Kliebenstein et al., (2002b), donde se encontró que la mutante *uvr8* en el fondo genético *Ler-0* no producía flavonoides en respuesta a UV-B, las plantas del genotipo *uvr8-6* no respondieron al tratamiento lumínico con incrementos en los niveles de estos compuestos (Figura 16 B-F). Es interesante notar que si bien estos autores reportaron diferencias sólo para compuestos flavonoides, en los experimentos de esta tesis el tratamiento de UV-B tampoco produjo incrementos en los niveles de sinapatos en las plantas *uvr8-6* (Figura 16-G).

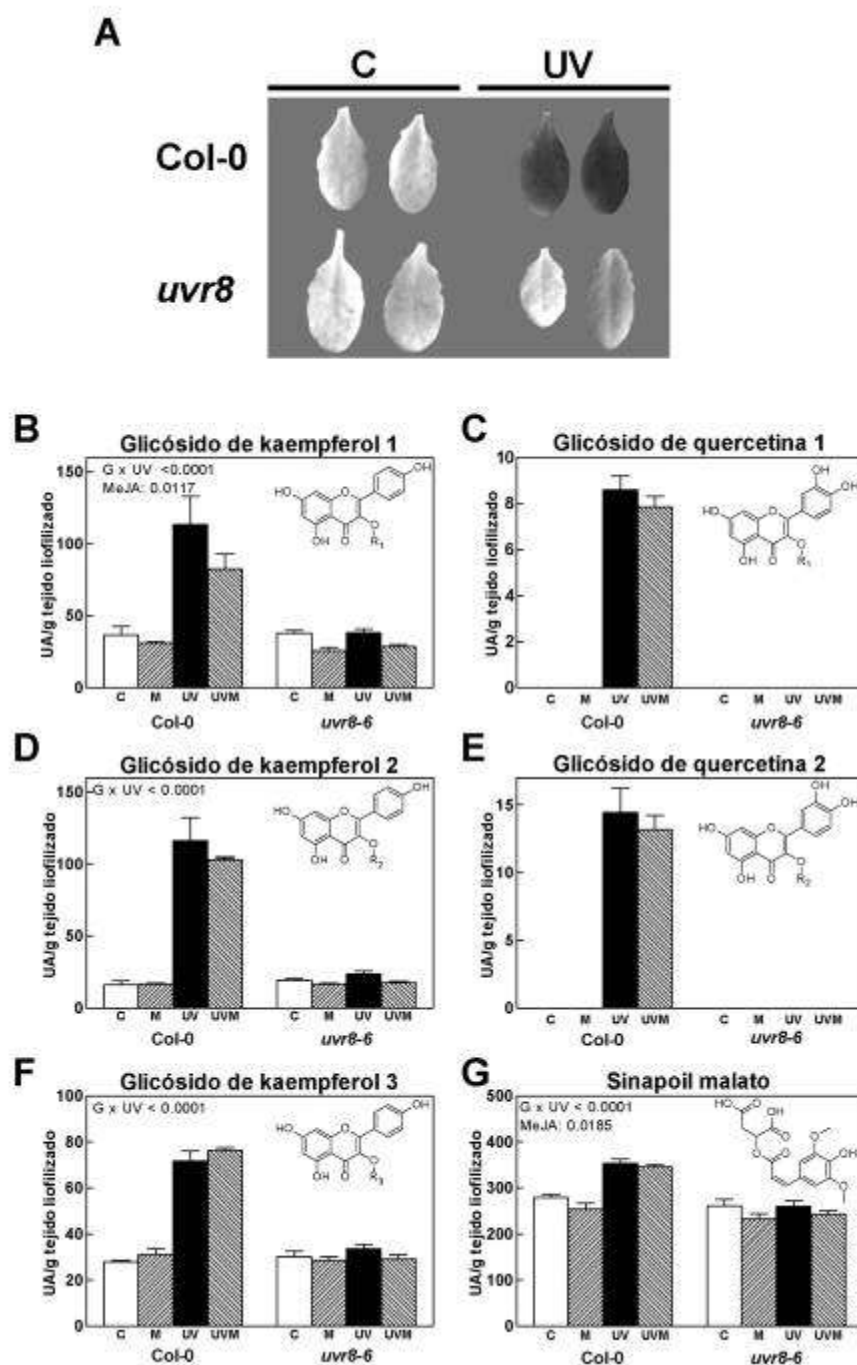


Figura 16: La radiación UV-B induce la acumulación de fenólicos foliares en forma UVR8-dependiente. **A)** Efecto de la radiación UV-B sobre la acumulación de compuestos fenólicos en la superficie foliar de plantas Col-0 y *uvr8-6*, mostrado mediante imágenes de fluorescencia de clorofila (ver materiales y métodos). La acumulación de compuestos fenólicos en la superficie foliar reduce la incidencia de la luz UV-B sobre la clorofila y en consecuencia las plantas que acumulan más compuestos fenólicos presentan una fluorescencia reducida en la imagen. **B-F)** Flavonoides cuantificados por HPLC en respuesta al tratamiento lumínico y la

aplicación de MeJA. **G)** Sinapatos. Las barras representan la media de cada tratamiento + ES (n = 4, cada una de las réplicas biológicas es un conjunto de tres plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo, MeJA, efecto de la aplicación exógena de metil jasmonato. Los datos para los glicósidos de kaempferol fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza. Los datos para los glicósidos de quercetina no fueron analizados estadísticamente porque sólo se alcanzaron niveles detectables de quercetina en las plantas Col-0 y únicamente en el tratamiento con UV-B.

El mismo patrón de inducción fue observado en experimentos realizados con plantas del ecotipo *Ler-0* y la mutante *uvr8* del fondo genético *Ler-0* (ver Apéndice). Hasta el momento se creía que la percepción de la radiación UV-B mediada por UVR8 controlaría la producción de flavonoides únicamente, mientras que la de otros compuestos fenólicos del tipo fenilpropanoides involucraría mecanismos de respuestas generales de estrés. Sin embargo, nuestros resultados indican que UVR8 también controla la síntesis de sinapatos en respuesta a UV-B. Esto último concuerda con datos de microarreglos de expresión génica publicados por Favory et al.(2009), donde se ve que el UV-B induce la expresión de genes como *FAH1* involucrados en la síntesis de sinapatos, mientras que en la mutante *uvr8-6* la expresión de esos genes no cambia frente al tratamiento lumínico.

A diferencia de lo observado en *N. attenuata* la aplicación exógena de MeJA no indujo la acumulación de fenilpropanoides, ya que ni los niveles de sinapoil malato ni los de sinapoil glucosa presentaron cambios significativos en los tratamientos de MeJA. En *A. thaliana*, el tratamiento con jasmonatos induce la producción de antocianinas, un efecto que es visible a simple vista en tallos y nervaduras. No se observaron diferencias evidentes en la acumulación de antocianinas en estos experimentos, sin embargo se trata de una apreciación visual ya que no fue posible cuantificar los niveles de antocianinas con las técnicas cromatográficas utilizadas.

El efecto de la radiación UV-B incrementando la resistencia a *B. cinerea* en *A. thaliana* en forma dependiente de UVR8 está relacionado a los niveles de sinapatos

Al inicio de este capítulo se presentaron resultados que demostraban que la exposición de plantas de *A. thaliana* a niveles de radiación UV-B similares a los del ambiente natural incrementaba la resistencia a dos agresores distintos:

a) La exposición de las plantas al UV-B afectó negativamente el desarrollo de larvas del lepidóptero *S. frugiperda*. En este caso, el efecto del UV-B incrementando las defensas en la planta se evidenció por la menor ganancia de biomasa de las larvas mantenidas en plantas previamente expuestas al UV-B. Este efecto no involucra la percepción del UV-B por UVR8 ya que se observó el mismo patrón en el crecimiento de las larvas mantenidas en las mutantes *uvr8-6*. Si bien en principio esto resulta sorprendente, existen respuestas al UV que no se encuentran mediadas por este fotorreceptor y que se discutirán más adelante que podrían explicar el patrón observado en estos experimentos.

b) La exposición de las plantas al UV-B incrementó la resistencia de las plantas a la infección por *B. cinerea*. En este caso, el efecto del UVB incrementando la defensa se evidenció por un menor desarrollo de las lesiones foliares, en comparación con plantas no expuestas. Este efecto tampoco parece involucrar la vía de JAs, ya que diversas líneas afectadas en la señalización de JAs y en la producción de metabolitos de defensa que requieren de la señalización de JAs para su inducción presentaron patrones similares en el desarrollo de las lesiones. Sin embargo este efecto depende claramente de la señalización por UVR8, ya que no se observa en las mutantes del fotorreceptor, lo que fue probado en dos ecotipos diferentes de *A. thaliana*.

Los blancos mejor conocidos del fotorreceptor UVR8 son los genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de flavonoides (Jenkins, 2009). Entre ellas, la enzima chalcona sintasa (CHS), que cataliza el primer paso de la vía y cuya regulación por UVR8 a nivel transcripcional ha sido extensamente caracterizada (Kliebenstein et al., 2002b; Brown et al., 2005; Favory et al., 2009). La falta de inducción de compuestos fenólicos en la superficie foliar en respuesta a la radiación UV-B es claramente visible en las imágenes de fluorescencia inducida de la clorofila de la Figura 16-A, donde se ve que en las plantas Col-0 decrece la fluorescencia de la clorofila en la epidermis de hojas tratadas con UV-B debido a la presencia de compuestos fenólicos, un efecto que se pierde en las mutantes *uvr8-6*.

Los análisis de metabolitos confirmaron además que tanto la quercetina como el kaempferol son fuertemente inducidos por los tratamientos de UV-B tanto en el ecotipo Col-0 como en el *Ler-0*, y que en ambos esa inducción se encuentra mediada por UVR8.

Además, en estos análisis se encontró que la acumulación de sinapatos en respuesta a la radiación UV-B también es un fenómeno dependiente de UVR8, hecho que hasta el momento no había sido demostrado.

Para determinar si esos compuestos juegan algún rol en la resistencia inducida a *B. cinerea* se realizaron nuevamente bioensayos con mutantes. En este caso se recurrió a la mutante *tt4-1*, de la línea de mutantes *transparent testa*, la cual carece del gen de la chalcona sintasa y por lo tanto no produce niveles detectables de flavonoides. Además de *tt4-1*, se utilizó la línea *fah1-7*, la cual carece de la enzima ferulato 5-hidroxilasa, involucrada en la síntesis de sinapoil glucosa y sinapoil malato (Meyer et al., 1996; Ruegger et al., 1999), por lo que esta mutante carece de sinapatos y de lignina de tipo S (ver el perfil de fenólicos de las mutantes en el Apéndice). En la Figura 17-A se muestra el esquema de la biosíntesis de fenólicos en *A. thaliana*, indicando las enzimas que se encuentran afectadas en cada mutante. El incremento en la resistencia producido por la exposición a UV-B se conservó en las mutantes *tt4-1*, indicando que los flavonoides no se encuentran involucrados en la resistencia a *B. cinerea* (Figura 17-B, panel izquierdo). Sin embargo, el efecto de la radiación UV-B se pierde por completo en las mutantes *fah1-7*, indicando que el incremento en la resistencia producido por la exposición a la radiación UV-B involucra en *A. thaliana* a los sinapatos (Figura 17-B, panel derecho).

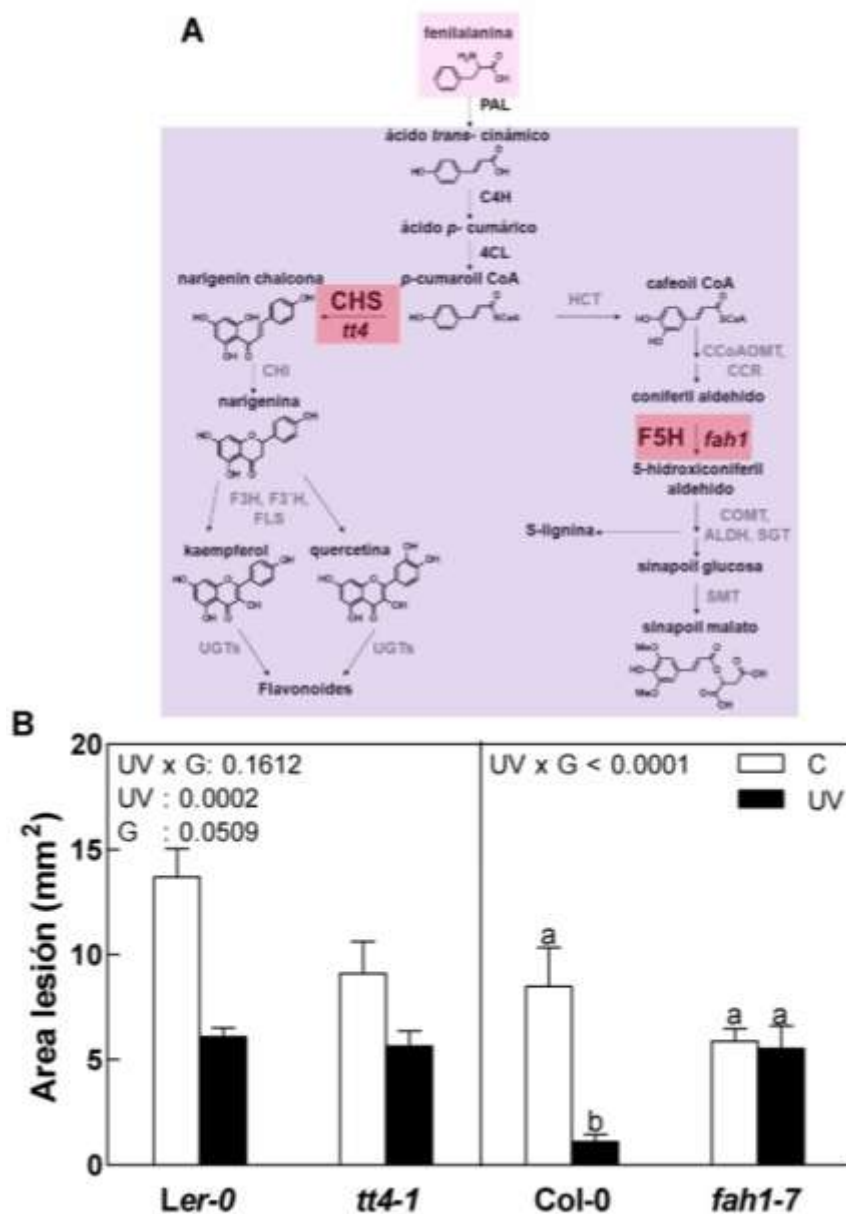


Figura 17: **A)** Representación esquemática de los principales pasos y enzimas involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos en *A. thaliana*, indicando las enzimas afectadas en las mutantes utilizadas (recuadros rojos). **B)** Efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia a *B. cinerea* en mutantes deficientes en la síntesis de flavonoides (*tt4-1*, panel izquierdo) y afectadas en la producción de sinapatos (*fah1-7*, panel derecho). Las barras representan la media para cada tratamiento + ES (n = 5-8 plantas individuales). UV, efecto del tratamiento lumínico de UV-B; G, efecto del genotipo. Cada mutante fue analizada respecto de su correspondiente fondo genético. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

Discusión

Los resultados obtenidos en los bioensayos realizados con mutantes de *A. thaliana* revelaron que el UV-B produjo incrementos en la resistencia tanto a insectos como hongos patógenos y que en ciertas condiciones el incremento en la resistencia producido por el UV-B depende del fotorreceptor UVR8. El trabajo presentado en esta tesis constituye el primer reporte sobre el rol del receptor UVR8 en la producción de compuestos de defensa como los glucosinolatos y la camalexina y sobre la producción de sinapatos en respuesta a la radiación UV-B.

La resistencia de las plantas a patógenos necrótrofos depende de la activación de la señalización por JAs (Glazebrook, 2005) y se conoce que las respuestas a los JAs pueden estar reguladas por la información ambiental proporcionada por los fotorreceptores (Moreno et al., 2009; Robson et al., 2010; Cerrudo et al., 2012). Esta regulación de la respuesta de JAs por la luz probablemente juegue un rol importante en condiciones naturales, modulando la localización de recursos entre crecimiento y defensa en función del contexto ecológico de la planta (Ballaré, 2009; Ballaré, 2011).

A diferencia de los resultados obtenidos con *N. attenuata*, no se ha encontrado en *A. thaliana* cambios en la sensibilidad a los JAs inducidos por la exposición a la radiación UV-B, y el análisis realizado sobre la expresión génica demuestra que ni los reguladores principales de la vía de JAs (las proteínas JAZ) ni los factores de transcripción controlados por los JAs están involucrados en el incremento de la resistencia. La posibilidad de contar con líneas mutantes específicas afectadas en componentes de la vía de transducción de señales permitió confirmar que el JA no está involucrado en el efecto del UV-B incrementando la resistencia a *B. cinerea*.

En *A. thaliana*, la resistencia contra *B. cinerea* depende de una variedad de proteínas de defensa, tales como las defensinas (Penninckx et al., 1996; Penninckx et al., 2003) y de metabolitos secundarios como los glucosinolatos, la camalexina y los compuestos fenólicos (Ferrari et al., 2003; Kliebenstein, 2004; Kliebenstein et al., 2005; Halkier y Gershenzon, 2006; Bednarek et al., 2009; Schlaeppli et al., 2010). Los resultados presentados en esta tesis confirman por una parte el rol clave que tienen los glucosinolatos indólicos y la camalexina (metabolitos derivados del triptófano) en la respuesta de defensa contra *B.*

cinerea, ya que los bioensayos con líneas mutantes afectadas en la producción de estos compuestos resultaron ser más sensibles al hongo (Figura 15). Sin embargo, estos metabolitos no son inducidos por la exposición de las plantas a la radiación UV-B en dosis representativas del ambiente natural (Figuras 13 y 14) ni tampoco explican el efecto de la radiación UV-B sobre la resistencia, ya que las mutantes evaluadas presentaron un patrón de respuesta al UV-B similar al del genotipo salvaje (Figura 15).

Con respecto al rol de los compuestos fenólicos, existen evidencias de que podrían participar de diversas maneras en la resistencia contra hongos patógenos (Goetz et al., 1999; Wurms et al., 2003; Terry et al., 2004; Guetsky et al., 2005) aunque existían hasta el momento muy pocos trabajos que investigasen el rol de estos compuestos en la respuesta de defensa contra hongos en *A. thaliana* (Ferrari et al., 2003; Kliebenstein et al., 2005). Los flavonoides, cuya síntesis se encuentra principalmente regulada a nivel de la enzima CHS, son fuertemente inducidos por la radiación UV-B y se sabe que actúan como fotoprotectores (Li et al., 1993) absorbiendo la radiación incidente. En los experimentos presentados con dosis de UV-B similares a las del ambiente natural, esta inducción fue completamente dependiente del fotoreceptor UVR8 (Figura 16). La dependencia de la síntesis de flavonoides con el fotoreceptor de UV-B es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado en los últimos años (Brown et al., 2005; Favory et al., 2009) y la mayoría de los trabajos estudian esta dependencia a nivel de la expresión del gen *CHS*. Esta tesis constituye el primer reporte de la dependencia de UVR8 para la síntesis de sinapatos en respuesta a la radiación UV-B, demostrando que UVR8 controla la activación por UV-B de la vía de los fenilpropanoides además de la de los flavonoides.

En los bioensayos realizados, el aumento de la resistencia a *S. frugiperda* por la exposición de las plantas al UV-B no parece ser una respuesta mediada por UVR8 ya que este efecto fue significativo aún en las mutantes *uvr8*. Sin embargo, el incremento en la resistencia a *B. cinerea* involucra al fotoreceptor, ya que no fue observado en las mutantes en respuesta a la radiación UV-B. Los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de expresión génica y metabolitos secundarios sugieren que los compuestos fenólicos podrían estar involucrados en este incremento de la resistencia y los bioensayos realizados con las mutantes *tt4-1* demostraron que este efecto no involucra a los flavonoides. Aparte de los flavonoides, los fenilpropanoides (compuestos C3C6) son también inducidos luego de la

exposición de las plantas al UV-B y se los considera importantes como fotoprotectores en *A. thaliana* y otras especies vegetales (Li et al., 1993; Landry et al., 1995; Mazza et al., 2000). Fenilpropanoides tales como el ácido cafeico, cumárico y otros ácidos hidroxicinámicos han sido relacionados previamente a tanto a la resistencia constitutiva como la inducible contra *B. cinerea* (Wurms et al., 2003) y otros hongos patógenos (Daayf et al., 2000). El ácido sinápico es un ácido hidroxicinámico que cumple un rol muy importante en las plantas, ya que forma parte del proceso de síntesis de siringil lignina (lignina S) en angiospermas y en algunas especies, como *A. thaliana*, se acumula en los tejidos formando ésteres solubles. Estudios previos que utilizaron la mutante *fah1* en bioensayos con *B. cinerea* no encontraron correlación entre los niveles de sinapatos y la resistencia contra la infección (Kliebenstein et al., 2005), sin embargo estos estudios no fueron realizados para estudiar los efectos del ambiente lumínico. Los sinapatos son inducidos por la radiación UV-B en *A. thaliana* (Li et al., 1993) y los resultados presentados en los ecotipos *Ler-0* y *Col-0* demuestran por primera vez que esta inducción se encuentra mediada por UVR8. Estos resultados son consistentes con los datos de microarreglos publicados por Favory et al. (2009), en los que se reportan incrementos del gen *FAH1* en respuesta a UV-B de manera UVR8-dependiente. Los bioensayos realizados con *B. cinerea* y la mutante *fah1-7* demuestran que en los tratamientos no suplementados con luz UV-B esta mutante presenta una resistencia a *B. cinerea* similar a *Col-0*, confirmando los resultados de Kliebenstein et al., (2005). Sin embargo, esta mutante se comportó de forma diferente al genotipo salvaje en los tratamientos con radiación UV-B, ya que no presentaron incrementos en la resistencia a *B. cinerea*. Esto demuestra que los sinapatos juegan un rol en el incremento de la resistencia a *B. cinerea* producido por la exposición a UV-B. Una explicación posible es que los sinapatos contribuyan a la resistencia al ser precursores de la síntesis de lignina S, la cual está involucrada en la fortificación de las paredes celulares y podría dificultar la penetración de las hifas dentro de las células (Kishimoto et al., 2006; Quentin et al., 2009; Lloyd et al., 2011).

Existen en la literatura reciente trabajos realizados con plantas pertenecientes a la familia Brassicaceae que reportan incrementos en glucosinolatos e incluso en genes de la vía de JAs y ácido salicílico (SA) en respuesta a la exposición UV-B (Mewis et al., 2012). Si bien los resultados de Mewis et al. (2012) difieren de lo observado en este capítulo cabe

destacar que las condiciones experimentales utilizadas son muy diferentes. Parte de los experimentos realizados en el trabajo de Mewis implican el uso de tratamientos cortos de UV-B y cosecha en el corto plazo luego de aplicado el tratamiento lumínico. También el uso de plantas de edad diferente y dosis de UV-B que si bien son representativas del ambiente natural están balanceadas con dosis de radiación PAR extremadamente bajas ($50 \mu\text{mol/m s}^2$) pueden explicar las diferencias encontradas. Los mismos autores señalan que el efecto del UV-B induciendo la expresión de genes y los niveles de metabolitos desaparecen cuando realizan experimentos con exposiciones a la radiación UV-B más prolongadas, indicando que los resultados de exposición a tiempos cortos sean probablemente consecuencia de respuestas de estrés generales de las plantas.

Conclusiones

En *A. thaliana*, a diferencia de *N. attenuata*, las respuestas de defensa inducidas por la radiación UV-B no parecen estar mediadas por el JA. La radiación UV-B no induce la señalización de JA ni sus metabolitos asociados ni parece afectar la sensibilidad de las respuestas mediadas por JA. Sin embargo, el UV-B incrementa la resistencia contra *S. frugiperda* y *B. cinerea*. Si bien el efecto negativo de la exposición de las plantas al UV-B sobre el desarrollo de *S. frugiperda* parece no depender de la percepción por UVR8, la resistencia a la infección por *B. cinerea* ocurre por mecanismos que son UVR8 dependientes e involucran a los sinapatos o metabolitos relacionados, Esto demuestra que al menos algunas respuestas de defensa inducibles por la radiación UV-B en plantas dependen de una vía de señalización mediada por el fotorreceptor de UV-B.

Capítulo 4

Discusión general

La luz es uno de los factores más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo también un importante regulador de las respuestas de defensa frente al ataque de insectos herbívoros y patógenos.

¿Por qué estudiar el rol de la radiación UV-B en el contexto planta-insecto o planta-patógeno?

Además de los efectos de la relación R: RL (proporción de radiación rojo/ rojo lejano percibida por las plantas) sobre la producción de defensas, que fueron estudiados por Moreno et al. (2009) y Cerrudo et al. (2012) entre otros, es bien conocido que la radiación UV-B solar también tiene influencia sobre las interacciones entre plantas y organismos consumidores. La mayor parte de los estudios demuestran que la exposición de plantas a la radiación UV-B tiene efectos negativos sobre la herbivoría. En un estudio reciente publicado por Kuhlmann y Müller (2011), las autoras encontraron que de un conjunto de 38 publicaciones relacionadas al efecto del UV-B sobre la herbivoría, en el 58% de los casos existía un efecto negativo sobre el desarrollo de los herbívoros, mientras que sólo un 13% mostraba un efecto contrario. En una revisión posterior, Ballaré et al. (2012) mostraron que si se consideran únicamente estudios donde el tratamiento de UV-B se realiza exponiendo a las plantas a la radiación natural en el campo, la proporción de estudios que demuestran un efecto negativo sobre el desarrollo y la supervivencia de los herbívoros, es aún mayor.

En el contexto agroeconómico, el incremento de la población mundial y el aumento en la demanda de materia prima para la alimentación y producción de biocombustibles plantean la necesidad de incrementar la producción global de cultivos de interés agronómico. Uno de los factores que mayormente afectan la productividad de los sistemas agrícolas son las adversidades fitosanitarias (insectos herbívoros y organismos patógenos, entre otros), que pueden llegar a causar pérdidas significativas en el rendimiento y en casos extremos la pérdida total de la producción (Oerke, 2006).

La mayor parte de los sistemas de producción agrícola a gran escala a nivel mundial utilizan estrategias de control de adversidades bióticas que tienen alto impacto sobre los ecosistemas y la salud humana. Estos factores, sumados a una preocupación creciente de la

sociedad por el uso de estrategias sustentables y la conservación de recursos naturales, conducen a un interés cada vez mayor en el desarrollo de estrategias de protección que sean amigables con el ambiente y que reduzcan el impacto de los sistemas productivos (Birch et al., 2011). Es en este contexto entonces que resulta de importancia comprender en mayor detalle los mecanismos de defensas que las plantas activan frente al ataque de organismos consumidores y cómo estos mecanismos son regulados por factores del ambiente. La radiación solar recibida por las plantas en un cultivo, incluyendo la región ultravioleta del espectro, es fuertemente afectada por la densidad de siembra y otras variables de manejo que afectan el desarrollo del índice de área foliar del cultivo. Dado el efecto de la radiación UV-B incrementando la defensa, es de particular interés comprender los mecanismos involucrados y el alcance de este fenómeno en la diversidad de las interacciones planta-ambiente-agresor biótico.

A comienzos de esta tesis no existía un consenso general sobre las causas del efecto negativo de la radiación UV-B solar sobre la herbivoría. Varios estudios habían demostrado cambios en los niveles de diversos tipos de defensas luego de la exposición de las plantas al UV-B. Por ejemplo, defensas mecánicas como los tricomas y diversos metabolitos secundarios entre los que se encuentran fenólicos, terpenos, ceras, poliaminas, proteínas inhibidoras de proteasas insectiles, e incluso fitoalexinas como la camalexina presentaron incrementos en experimentos con tratamientos de exposición a UV-B (Kuhlmann y Müller, 2011). Sin embargo, se desconocían los mecanismos que mediaban estas respuestas a la radiación UV-B. En muchos de los estudios de laboratorio citados en esta tesis, donde se evaluaron los niveles de expresión génica y metabolitos secundarios, los tratamientos de UV-B mostraron la capacidad de producir cambios a nivel bioquímico en las plantas. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios previos, se utilizaron dosis de UV-B elevadas y difícilmente esperables en el ambiente natural. En otros casos, los resultados se obtuvieron exponiendo plantas no aclimatadas a pulsos de UV de corta duración, que tampoco son representativos de condiciones ecológicamente relevantes. En esos experimentos, las respuestas obtenidas podrían adjudicarse a una respuesta general de estrés, que posiblemente no tuviese un significado funcional en ambientes naturales. Son pocos los estudios hasta la fecha que evalúan la influencia de la radiación UV-B sobre los mecanismos de defensa utilizando dosis ecológicamente representativas. Además, el trabajo

presentado en esta tesis es el primero en evaluar el rol del JA en el incremento de la defensa producido por el UV-B utilizando líneas deficientes en la producción de esta hormona, y es el único hasta el momento donde se evaluó directamente el rol del fotorreceptor UVR8 en el incremento de la resistencia producido por la radiación UV-B.

El tipo de tratamiento de UV-B utilizado en esta tesis merece algunas consideraciones respecto de otros observados en la literatura. Las dosis y tiempos de exposición utilizados buscaron ser comparables a los de los ambientes naturales de donde provenían las plantas. Además se buscó balancear la radiación UV-B con los niveles de PAR, algo que no es tenido en cuenta en otros estudios publicados, donde se realizaron ensayos en cámaras de cultivo que utilizan niveles de radiación UV-B similares a los naturales pero con niveles de PAR extremadamente bajos. Este tipo de tratamientos desbalanceados suelen exacerbar las respuestas de estrés en las plantas, ya que éstas no disponen de suficiente PAR para activar mecanismos de reparación (como, por ejemplo, la fotoreactivación) (Teramura et al., 1990). Si bien quizá la mejor opción hubiese sido utilizar diseños donde el tratamiento de UV-B fuese el propio UV-B solar natural, los ensayos de suplementación con lámparas en el invernáculo permiten manipular selectivamente la radiación UV-B como factor, manteniendo relativamente constantes otros factores difíciles de controlar en experimentos de campo, como la humedad (que puede influir sobre las interacciones entre plantas y patógenos), la temperatura y la presencia de insectos y otros organismos que pueden alterar la uniformidad de las respuestas a evaluar.

Tomando como base el esquema planteado en la introducción general (Figura 1), se plantearon los posibles puntos de convergencia entre las respuestas al UV-B y las respuestas de defensa contra herbívoros y patógenos, a partir de los que se elaboraron las diversas hipótesis que se pusieron a prueba en el transcurso de esta tesis.

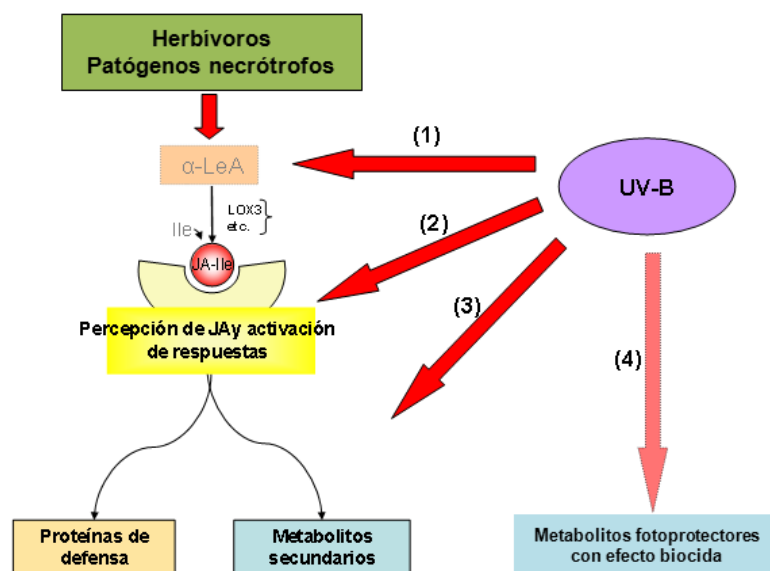


Figura 1: Mecanismo general de respuesta al ataque de herbívoros o patógenos necrótrofos y las etapas donde la radiación UV-B podría estar afectando la respuesta de defensa. Modificado de Demkura et al. (2010).

Los experimentos realizados permiten responder una serie de preguntas relacionadas a este esquema. Éstas se detallan a continuación

1-¿Produce el UV-B una modificación directa en los niveles de JAs bioactivos?

Las hormonas vegetales regulan eventos importantes en el desarrollo de las plantas, tales como el crecimiento, la reproducción y las respuestas al estrés. Las que se encuentran principalmente involucradas en las respuestas a diversos tipos de estrés son el ácido absícico (ABA), el ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y los jasmonatos (JAs). Estas dos últimas hormonas se encuentran principalmente involucradas en las respuestas de defensa contra insectos y patógenos necrótrofos. Existen evidencias de que la exposición a la radiación UV-B incrementa los niveles de ET (A. H. Mackerness et al., 1999). Sin embargo estos ensayos previos fueron realizados con tratamientos de UV-B no representativos del ambiente natural y podrían no reflejar situaciones reales, ya que si bien la dosis de UV-B utilizada alcanzó un valor puntual de $3,2 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, la exposición de las plantas fue realizada durante un período diario de 12h con un nivel de PAR relativamente bajo ($150 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Incluso los autores del trabajo reportaron la presencia de síntomas de daño

foliar causados por la exposición a la radiación UV-B, un fenómeno que difícilmente se observa en condiciones de exposición a la radiación natural. En los experimentos realizados por Caputo et al. (2006), en los que se utilizó la radiación solar como fuente de UV-B, se encontró que la exposición de plantas de *A. thaliana* a la radiación UV-B era capaz de reducir la tasa de oviposición de *Plutella xylostella*, sin embargo el efecto del UV-B disminuyendo la oviposición fue observado aún en mutantes de la vía del ET. Por lo tanto, la poca evidencia disponible sugiere que el efecto del UV-B sobre la respuesta de defensa en ambientes naturales no está relacionado con cambios en la producción de ET.

Con respecto a los JAs, los experimentos reportados por A. H. Mackerness también indicaron que el tratamiento de UV-B utilizado incrementa los niveles de JA, aunque el significado de estos experimentos sería objetables por las mismas razones expuestas en el párrafo anterior. Por otro lado, en los experimentos de Izaguirre et al. (2003), realizados en condiciones de campo con plantas de *N. longiflora*, se demostró que las plantas expuestas al UV-B solar presentaban un incremento en el nivel de transcriptos del gen de la lipoxigenasa (*LOX*), un gen que está involucrado en los primeros pasos de la síntesis de JAs. Esos resultados indicarían que las plantas expuestas al UV-B solar podrían tener mayores niveles de JAs. Sin embargo, en los experimentos presentados en esta tesis, el tratamiento de UV-B no fue capaz de producir incrementos en los niveles de JAs bioactivos, aún en plantas que habían sido previamente expuestas a tratamientos de herbivoría simulada. Experimentos recientes realizados con *N. attenuata* en condiciones naturales por Đinh et al. (2012) concuerdan con los resultados de esta tesis en el hecho de que la exposición a UV-B *per se* no incrementa los niveles de JAs. Sin embargo, Đinh et al. (2012) encontraron que el UV-B sí incrementó significativamente los niveles de JAs bioactivos inducidos por el ataque de *M. sexta*, mientras que el incremento fue menor o completamente nulo en plantas previamente atacadas por *Trichoplusia ni*. En los experimentos de esta tesis los tratamientos de herbivoría simulada fueron realizados con secreciones orales de *S. frugiperda* y si bien este tratamiento induce la producción de fenólicos de forma similar a la de los tratamientos con *M. sexta* (ver Apéndice), la especificidad de la respuesta de inducción de JA en *N. attenuata* frente a su principal enemigo natural podría explicar la diferencia con los resultados de Đinh et al. (2012). Cabe destacar que los resultados de esta tesis junto con los publicados este año por Đinh son los primeros experimentos donde se

miden los niveles no sólo de JA, sino también de sus conjugados bioactivos en respuesta a tratamientos de UV-B ecológicamente representativos.

2- El efecto de la radiación UV-B, ¿se encuentra relacionado a incrementos en la sensibilidad de los tejidos al JA?

Los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a los niveles de JAs bioactivos, analizados en conjunto con los de Dinh et al. (2012), aportan evidencias a la hipótesis de que la radiación UV-B en los ambientes naturales podría estar potenciando y no induciendo *per se* las respuestas de defensa. En este aspecto, los resultados mostrados en las Figura 11 del Capítulo 2 confirman que la radiación UV-B incrementa significativamente la inducción por herbivoría de uno de los componentes más importantes del repertorio de defensas de *N. attenuata*, los TPIs. Más aún, este incremento en la respuesta de defensa inducida por herbivoría es JA-dependiente, porque no se manifiesta en plantas deficientes en la producción de JAs, como las *as-lox*. Los resultados presentados en la Figura 13 de ese mismo capítulo muestran claramente que, en *N. attenuata*, la radiación UV-B aumenta la sensibilidad de las plantas a JA.

Para profundizar más en la explicación mecanística de este fenómeno, fue necesario examinar la respuesta de componentes reguladores y elementos involucrados en la transducción de señales de la vía del JA. Dadas las limitaciones que presentaba *N. attenuata* como modelo, se evaluaron los distintos componentes reguladores de la vía de transducción de señales de JA en *A. thaliana*. Uno de los principales elementos involucrados en la transducción de señales de la vía del JA son los represores JAZ, y hubiésemos esperado que la expresión de genes *JAZ* estuviera controlada por UV-B. Contrario a lo esperado, si bien en nuestros experimentos la expresión de *JAZ10* resultó ser inducible por JA, no se encontraron diferencias entre el tratamiento de UV-B y el control (Figura 10-A, Capítulo 3). A diferencia de lo observado en *N. attenuata* para el gen de *TPI*, tampoco encontramos efectos del UV-B sobre otros marcadores de la respuesta a JA en *A. thaliana* (Figura 10 B-F, Capítulo 3). A pesar de las diferencias con *N. Attenuata*, en *A. thaliana*, la exposición de las plantas al UV-B también produce incrementos en la resistencia a la herbivoría, tal como se ve en los bioensayos realizados con *S. frugiperda* (Figura 8, Capítulo 3), e incluso incrementa la resistencia al ataque de patógenos necrótrofos como *B. cinerea* (Figura 9,

Capítulo 3). Estos resultados tomados en conjunto indican que los mecanismos por los cuales el UV-B incrementa la resistencia a herbívoros y patógenos presentan variabilidad entre distintas especies. Experimentos llevados a cabo por Adebobola (2012) con líneas recombinantes endocriadas (RILs en inglés) de *A. thaliana* mostraron que la exposición a radiación UV-B natural reduce la colonización por insectos, pero que existe además un efecto significativo del genotipo sobre la respuesta a la radiación UV-B. Estos resultados indican que existe variabilidad en el incremento de la resistencia producido por la radiación UV-B incluso entre plantas pertenecientes a la misma especie. En este aspecto, la variabilidad natural en la respuesta al UV-B sería un carácter de gran interés a explorar en variedades de una misma especie.

En cuanto a la diferencias observadas entre *A. thaliana* y *N. attenuata*, resulta claro que esta última presenta un incremento en la sensibilidad a JA producida por la exposición a UV-B. En un estudio publicado recientemente, Oh et al. (2012) identificaron 12 genes que codifican para proteínas JAZ en *N. attenuata*. Entre los genes identificados se encuentra *NaJAZh*, que codifica para una proteína JAZ que se expresa en tejido foliar y es inducible por herbivoría. Mediante el uso de líneas transgénicas silenciadas en la expresión de este gen, los autores demostraron que las plantas que no expresan *NaJAZh* (con menores niveles del represor), presentan una mayor inducción de defensas por herbivoría, lo que se denota por un incremento en la producción de TPIs y defensas como los DTGs y la cafeoil putrescina, sin que se vean alterados los niveles de JAs bioactivos. Estos resultados serían consistentes con el incremento en la sensibilidad al JA producido por el UV-B en *N. attenuata* demostrado en los experimentos de esta tesis, y sería interesante evaluar el comportamiento de los represores JAZ en *N. attenuata* en respuesta a herbivoría y UV-B para poder comprender en grado mayor las diferencias con respecto a *A.thaliana*.

3- ¿Existe una vía en común para la inducción de metabolitos de defensa por la radiación UV-B, el ataque de insectos herbívoros y la infección de patógenos?

El UV-B incrementa la resistencia en plantas a insectos y algunos patógenos, y teniendo en cuenta experimentos como los de Izaguirre et al. (2007), donde se demuestra que existe una superposición en cuanto a la producción de ciertos metabolitos de defensa en respuesta a la radiación UV-B y la herbivoría, era lógico pensar que al menos parte del

repertorio de metabolitos inducibles por UV-B es producido por las mismas vías que las activadas por la herbivoría. Esto llevó a pensar nuevamente en la vía del JA como nexo común, motivo por el cual en esta tesis se realizaron experimentos cuya finalidad fue evaluar la producción de metabolitos secundarios en respuesta a UV-B y herbivoría, pero aprovechando por primera vez la disponibilidad de líneas deficientes en la producción de JAs. De los metabolitos secundarios más abundantes en *N. attenuata* a nivel foliar, los ensayos se focalizaron en analizar el repertorio de compuestos fenólicos, ya que estos presentan una respuesta clara y reproducible a la radiación UV-B.

El uso de las líneas *as-lox* permitió asignar por primera vez un rol directo a la vía del JA en la producción de al menos parte del repertorio de compuestos fenólicos en respuesta a la radiación UV-B. Con respecto a la producción de flavonoides y fenilpropanoides solubles como el ácido clorogénico, los resultados de esta tesis suman evidencia consistente con resultados previos de la literatura, donde se muestra que la producción de estos compuestos no se incrementa en respuesta a la aplicación exógena de JA y es incluso levemente reprimida por la herbivoría (Keinänen et al., 2001; Roda et al., 2003; Wu et al., 2008, entre otros). Además, los experimentos de esta tesis comprueban que la inducción de estos compuestos por la radiación UV-B no depende del JA. Uno de los resultados más interesantes presentados en este trabajo es la demostración de que la vía de JA es necesaria para la inducción por UV-B de poliaminas conjugadas como la cafeoil putrescina y la dicafeoil espermidina. Este tipo de compuestos se acumula en forma soluble en hojas de otras especies de solanáceas, como el tomate y el tabaco (Chen et al., 2006; Gális et al., 2006) y son marcadamente inducidos por la herbivoría. Las poliaminas conjugadas han sido relacionadas a la protección contra el estrés oxidativo y dado que una de los efectos de la radiación UV-B sobre las plantas podría ser un incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), la producción de poliaminas conjugadas en respuesta al UV-B podría constituir un mecanismo general de adaptación en solanáceas que cumplen la mayor parte de su etapa vegetativa en momentos del año donde los niveles de radiación UV-B natural son mayores. Es interesante notar que cuando plantas de *N. attenuata* del genotipo WT y el genotipo *as-lox* fueron expuestas a dosis extremas de UV-B, en las líneas deficientes se observó la aparición de lesiones en las hojas, mientras que las WT presentaron mayor resistencia a la radiación UV-B (Demkura et al., 2010). Las

poliaminas conjugadas también han sido relacionadas con la resistencia a insectos (Kaur et al., 2010), mientras que las poliaminas libres se encuentran involucradas en la defensa contra patógenos (Marina et al., 2008); sería posible pensar que en ciertos ambientes las plantas capaces de producir estos compuestos tanto en respuesta a UV-B como herbivoría o patógenos han sido favorablemente seleccionadas. Sería por ello interesante evaluar los patrones de producción de estos compuestos en diversos ecotipos de *N. attenuata* y otras especies relacionadas. En cuanto a la especificidad de la inducción de diversos compuestos fenólicos por UV-B y por JA, el trabajo de Kaur et al. (2010) con *N. attenuata* publicado casi en simultáneo con experimentos realizados en esta tesis (Demkura et al., 2010) mostró que existen factores de transcripción que regulan específicamente la producción de estos compuestos y que son completamente dependientes del JA. Además, experimentos presentados en ese trabajo con líneas transgénicas deficientes en la producción de poliaminas conjugadas, demostraron que estos compuestos son inducibles por el ataque de herbívoros y actuarían en la respuesta de defensa, y no sólo como moléculas de protección frente al estrés producido por la radiación UV-B.

Con respecto a otros metabolitos secundarios, si bien los experimentos de Dinh et al. (2012) registraron incrementos en la producción de DTGs en plantas expuestas a la radiación UV-B natural, en nuestros ensayos no encontramos cambios en la acumulación de estos metabolitos. La producción de los DTGs es dependiente de la vía de JA y estos compuestos son un componente importante de la defensa en *N. attenuata* (Jassbi et al., 2008). La diferencia de nuestros resultados con los de Dinh et al. (2012) refleja diferencias en la cinética de producción o diferencias asociadas a las técnicas analíticas disponibles. Además, en el trabajo mencionado los autores no presentan resultados concluyentes que permitan determinar que el efecto del UV-B sobre la herbivoría implica a los DTGs.

En base a lo expuesto resulta claro que el UV-B y la herbivoría inducen metabolitos secundarios que se encuentran regulados por la misma vía de transducción de señales, aunque esta superposición en las vías de respuesta depende de la especie, ya que en *A. thaliana* los metabolitos comunes de defensa inducibles por JA no presentaron respuesta al tratamiento con UV-B. Es necesario evaluar la respuesta al UV-B y a la herbivoría en otras especies modelo para poder elaborar conclusiones con más detalle.

4- Cuál es el rol del fotorreceptor UVR8 en el aumento de la resistencia producido por la exposición a la radiación UV-B?

Los experimentos presentados en esta tesis analizan por primera vez el rol de la proteína UVR8 en las respuestas de defensa contra la herbivoría y el ataque de patógenos. Hasta el momento la función de UVR8 solo se había estudiado en el contexto de las respuestas de fotoprotección al UV-B y sólo recientemente se caracterizó esta proteína como un fotorreceptor de la radiación UV-B. A comienzos de esta tesis, trabajos como los de Kliebenstein et al. (2002b), Brown et al. (2005), Brown y Jenkins (2008), Cloix et al. (2008), Favory et al. (2009), entre otros, demostraron que UVR8 regula respuestas específicas incluso a bajas fluencias de UV-B, entre las que se encuentran la inhibición del alargamiento del hipocotilo en plántulas, y la síntesis de flavonoides. El trabajo presentado en esta tesis es el primero en demostrar que UVR8 está también involucrada en la síntesis de fenilpropanoides, como los sinapatos, en respuesta a la radiación UV-B. Además, en base a los experimentos realizados, se demostró por primera vez el rol de este fotorreceptor en la resistencia contra patógenos como *B. cinerea*. La ventaja de disponer en *A. thaliana* de líneas mutantes que presentan deficiencias específicas en algunos metabolitos secundarios permitió relacionar el incremento en la resistencia a *B. cinerea* con los sinapatos. Como proyecto a futuro sería interesante identificar y caracterizar homólogos de UVR8 en *N. attenuata* y evaluar su rol sobre las defensas dependientes de JA que son inducibles por el UV-B, como los TPIs o las poliaminas conjugadas, antes de descartar por completo una interacción entre la percepción del UV-B por UVR8 y la inducción de defensas dependientes de JA. Tampoco se puede descartar que los mecanismos de defensa inducidos por el UV-B en *A. thaliana* actúen por vías independientes de UVR8. De hecho en los bioensayos realizados con *S. frugiperda* presentados en el Capítulo 3 de esta tesis se puede ver que la exposición de las plantas al UV-B tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de las larvas, aún en la mutante *uvr8-6*, indicando que existen respuestas de defensa inducibles por el UV-B que no pasan por la percepción de la radiación por este fotorreceptor. Sin embargo, los resultados observados en los experimentos con *S. frugiperda* no pueden relacionarse directamente con cambios en metabolitos secundarios, ya que en *A. thaliana* el tratamiento de UV-B no tuvo efecto sobre la producción de metabolitos secundarios inducibles por JAs (como los glucosinolatos) y los metabolitos

secundarios evaluados que fueron inducidos por el UV-B resultaron ser dependientes de UVR8. En este aspecto, Adebobola (2012) evaluó la densidad de tricomas en hojas de *A. thaliana* como carácter de defensa contra insectos y como resultado de sus experimentos observó un incremento en la densidad de tricomas dependiente del tratamiento de UV-B. El incremento en la densidad de tricomas podría tener efectos negativos respecto a la accesibilidad a los tejidos por las larvas de *S. frugiperda*, y podría explicar lo observado en los bioensayos de esta tesis. Es interesante notar que el incremento en la densidad de tricomas es un fenómeno dependiente de JA y se produce también en respuesta a herbivoría. Si bien el incremento en la densidad de tricomas ha sido registrado en respuesta al UV-B en otras especies, se desconoce si esta respuesta es dependiente o no de la percepción por UVR8.

Como conclusión general, no parece existir un único mecanismo que explique el incremento de la resistencia a herbívoros y patógenos en plantas expuestas a la radiación UV-B en ambientes naturales, y es evidente que el aumento en la resistencia presenta variabilidad entre especies y aún dentro de una misma especie vegetal. Existe una superposición entre algunas respuestas al UV-B y las respuestas de defensa, que tienen al JA como nexos, y que se manifiestan en especies como *N. attenuata*. En otras especies, como *A. thaliana* el incremento en la resistencia se da por vías independientes de JA debido a efectos negativos de los compuestos fotoprotectores sobre los agresores bióticos. Un camino a seguir como continuación de los resultados presentados en este trabajo sería explorar la variabilidad de las respuestas de defensa en distintas especies con relación al ambiente lumínico de su hábitat natural, con el fin de adquirir un grado mayor de conocimiento que permita aplicar modificaciones del ambiente lumínico para aumentar la productividad de cultivos de acuerdo a la especie y al ambiente en las que se desarrollan.

Bibliografía

- A.-H.-Mackerness S, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B** (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1413–1423
- Abe H, Shimoda T, Ohnishi J, Kugimiya S, Narusaka M, Seo S, Narusaka Y, Tsuda S, Kobayashi M** (2009) Jasmonate-dependent plant defense restricts thrips performance and preference. *BMC Plant Biology* **9**: 97
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis Book*. doi: <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0012>
- Adebobola IN** (2012) Evolutionary ecology of *Arabidopsis thaliana*: Interactions with biotic and abiotic environmental factors. PhD Thesis. Bowling Green State University, USA. http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc_num=bgsu1351039606
- Alvarez S, He Y, Chen S** (2008) comparative investigations of the glucosinolate–myrosinase system in *Arabidopsis* suspension cells and hypocotyls. *Plant and Cell Physiology* **49**: 324–333
- Andrade A, Vigliocco A, Alemano S, Miersch O, Botella MA, Abdala G** (2005) Endogenous jasmonates and octadecanoids in hypersensitive tomato mutants during germination and seedling development in response to abiotic stress. *Seed Science Research* **15**: 309–318
- Bak S, Tax FE, Feldmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R** (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **13**: 101–111
- Baldwin IT** (2001) An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology* **127**: 1449–1458
- Ballaré CL, Barnes PW, Flint SD, Price S** (1995) Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. II. Time-course, comparison with flavonoid responses and adaptive significance. *Physiologia Plantarum* **93**: 593–601

- Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ** (1996) Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiology* **112**: 161–170
- Ballaré CL, Cecilia Rousseaux M, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Matthew Robson T, Caldwell MM, Sala OE, Scopel AL** (2001) Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **62**: 67–77
- Ballaré CL** (2009) Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant, Cell and Environment* **32**: 713–725
- Ballaré CL** (2011) Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science* **16**: 249–257
- Ballaré CL, Mazza CA, Austin AT, Pierik R** (2012) Canopy light and plant health. *Plant Physiology* **160**: 145–155
- Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C** (2000) The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 14819–14824
- Barnes PW, Searles PS, Ballaré CL, Ryel RJ, Caldwell MM** (2000) Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum* **109**: 274–283
- Bassman JH** (2004) Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochemistry and Photobiology* **79**: 382–398
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A,**

- Molina A, Schulze-Lefert P** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101–106
- Beekwilder J, van Leeuwen W, van Dam NM, Bertossi M, Grandi V, Mizzi L, Soloviev M, Szabados L, Molthoff JW, Schipper B, Verbocht H, de Vos RCH, Morandini P, Aarts MGM, Bovy A** (2008) The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **3**: e2068
- Bender J, Celenza J** (2009) Indolic glucosinolates at the crossroads of tryptophan metabolism. *Phytochemistry Reviews* **8**: 25–37
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R** (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* **29**: 23–32
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell Online* **19**: 148–162
- Bi JL, Murphy JB, Felton GW** (1997) Antinutritive and oxidative components as mechanisms of induced resistance in cotton to *Helicoverpa zea*; *Journal of Chemical Ecology* **23**: 97–117
- Bilger W, Veit M, Schreiber L, Schreiber U** (1997) Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* **101**: 754–763
- Birch AN, Begg GS, Squire GR** (2011) How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. *Journal of Experimental Botany* **62**: 3251–3261
- Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, Ballaré CL** (2001) ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-b-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 780–788

- Braun J, Tevini M** (1993) Regulation of uv-protective pigment synthesis in the eipermal layer of rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Kustro). Photochemistry and Photobiology **57**: 318–323
- Britt A** (2004) Repair of DNA damage induced by solar UV. Photosynthesis Research **81**: 105–112
- Brosche M, Schuler MA, Kalbina I, Connor L, Strid A** (2002) Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. Photochemical and Photobiological Sciences **1**: 656–664
- Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenzon J** (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry **62**: 471–481
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI** (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 18225–18230
- Brown BA, Jenkins GI** (2008) UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature Arabidopsis leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. Plant Physiology **146**: 576–588
- Browse J** (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. Annual Review of Plant Biology **60**: 183–205
- Caldwell MM** (1971) Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. In AC Giese, ed, Photophysiology, Vol VI: Current Topics in Photobiology and Photochemistry Academic Press, New York 131–177
- Caldwell MM, Ballaré CL, Bornman JF, Flint SD, Bjorn LO, Teramura AH, Kulandaivelu G, Tevini M** (2003) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. Photochemical and Photobiological Sciences **2**: 29–38

- Caldwell MM, Bornman JF, Ballare CL, Flint SD, Kulandaivelu G** (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**: 252–266
- Caputo C, Rutitzky M, Ballaré C** (2006) Solar ultraviolet-B radiation alters the attractiveness of Arabidopsis plants to diamondback moths (*Plutella xylostella*; L.): impacts on oviposition and involvement of the jasmonic acid pathway. *Oecologia* **149**: 81–90
- Casati P, Walbot V** (2004) Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* **5**: R 16
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrih H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J** (2005) The Arabidopsis ATR1 MYB transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiology* **137**: 253–262
- Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CMJ, Ballaré CL** (2012) Low Red/Far-Red ratios reduce Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiology* **158**: 2042–2052
- Chapple CC, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR** (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell Online* **4**: 1413–1424
- Chen H, Jones AD, Howe GA** (2006) Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters* **580**: 2540–2546
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671

- Chini A, Fonseca S, Chico JM, Fernández-Calvo P, Solano R** (2009) The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant Journal* **59**: 77–87
- Chung HS, Howe GA** (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **21**: B131–145
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA** (2008) Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* **146**: 952–964
- Chung HS, Niu Y, Browse J, Howe GA** (2009) Top hits in contemporary JAZ: An update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* **70**: 1547–1559
- Cipollini D, Enright S, Traw MB, Bergelson J** (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology* **13**: 1643–1653
- Cloix C, Jenkins GI** (2008) Interaction of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Molecular Plant* **1**: 118–128
- Conconi A, Smerdon MJ, Howe GA, Ryan CA** (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**: 826–829
- Cuadra P, Harborne JB, Waterman PG** (1997) Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* **45**: 1377–1383
- Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara BS, Olszyk DM** (1997) Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **101**: 301–308
- Daayf F, Ongena M, Boulanger R, El Hadrami I, Bélanger RR** (2000) Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and

powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 1579–1593

De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A (2012) Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* **17**: 349–359

Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballaré CL (2010) Jasmonate –dependent and independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**: 1084–1095

Demkura PV, Ballaré CL (2012) UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant* **5**: 116–126

Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **19**: 2225–2245

Đinh ST, Gális I, Baldwin IT (2012) UVB radiation and 17-hydroxygeranyllinalool diterpene glycosides provide durable resistance against mirid (*Tupiocoris notatus*) attack in field-grown *Nicotiana attenuata* plants. *Plant, Cell and Environment* DOI:10.1111/j.1365-3040.2012.02598.x

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 479–501

Elad Y (1991) An inhibitor of polyamine biosynthesis — Difluoromethylornithine — and the polyamine spermidine for the control of gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* **19**: 201–209

Elliger CA, Wong Y, Chan BG, Waiss AC (1981) Growth inhibitors in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruitworm (*Heliothis zea*). *Journal of Chemical Ecology* **7**: 753–758

- Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P** (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5–51
- Favory J-J, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Seidlitz HK, Nagy F, Ulm R** (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **28**: 591–601
- Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei É, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schäfer E, Ulm R, Nagy F** (2011) Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS8-controlled UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **67**: 37–48
- Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* **144**: 367–379
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM** (2003) *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The Plant Journal* **35**: 193–205
- Foggo A, Higgins S, Wargent J, Coleman R** (2007) Tri-trophic consequences of UV-B exposure: plants, herbivores and parasitoids. *Oecologia* **154**: 505–512
- Fraser CM, Chapple C** (2011) The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* e0152
- Fukuda S, Satoh A, Kasahara H, Matsuyama H, Takeuchi Y** (2008) Effects of ultraviolet-B irradiation on the cuticular wax of cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Journal of Plant Research* **121**: 179–189
- Futuyma DJ, Agrawal AA** (2009) Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 18054–18061

- Gális I, Šimek P, Narisawa T, Sasaki M, Horiguchi T, Fukuda H, Matsuoka K** (2006) A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *The Plant Journal* **46**: 573–592
- Gao C, Xing D, Li L, Zhang L** (2008) Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Planta* **227**: 755–767
- Gigolashvili T, Berger B, Mock H-P, Müller C, Weisshaar B, Flügge U-I** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **50**: 886–901
- Giordano CV, Galatro A, Puntarulo S, Ballaré CL** (2004) The inhibitory effects of UV-B radiation (280–315 nm) on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with oxidative damage to lipids. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1415–1423
- Giordano CV, Mori T, Sala OE, Scopel AL, Caldwell MM, Ballaré CL** (2003) Functional acclimation to solar UV-B radiation in *Gunnera magellanica*, a native plant species of southernmost Patagonia. *Plant, Cell and Environment* **26**: 2027–2036
- Glawischnig E** (2007) Camalexin. *Phytochemistry* **68**: 401–406
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227
- Goetz G, Fkyerat A, Métais N, Kunz M, Tabacchi R, Pezet R, Pont V** (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759–767
- González Besteiro MA, Bartels S, Albert A, Ulm R** (2011) Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *The Plant Journal* **68**: 727–737

- González JA, Rosa M, Parrado MF, Hilal M, Prado FE** (2009) Morphological and physiological responses of two varieties of a highland species (*Chenopodium quinoa* Willd.) growing under near-ambient and strongly reduced solar UV-B in a lowland location. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **96**: 144–151
- Gordon DC, Percy KE, Riding RT** (1998) Effects of UV-B radiation on epicuticular wax production and chemical composition of four *Picea* species. *New Phytologist* **138**: 441–449
- Govrin EM, Levine A** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**: 751–757
- Guetsky R, Kobiler I, Wang X, Perlman N, Gollop N, Avila-Quezada G, Hadar I, Prusky D** (2005) Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Phytopathology* **95**: 1341–1348
- Halitschke R, Baldwin IT** (2003) Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* **36**: 794–807
- Halkier BA, Gershenzon J** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303–333
- Hatcher PE, Paul ND** (1994) The effect of elevated UV-B radiation on herbivory of pea by *Autographa gamma*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **71**: 227–233
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* **125**: 683–700
- Hockberger PE** (2002) A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* **76**: 561–579

- Hoffland E, Dicke M, Van Tintelen W, Dijkman H, Van Beusichem ML** (2000) Nitrogen availability and defense of Tomato against two-spotted spider mite. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 2697–2711
- Hoffman RW, Campbell BD, Bloor SJ, Swinny EE, Markham KR, Ryan KG, Fountain DW** (2003) Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. – physiological links to plant productivity and water availability. *Plant, Cell and Environment* **26**: 603–612
- Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA** (2008) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* **54**: 57–83
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 41–66
- Ibañez S, Rosa M, Hilal M, González JA, Prado FE** (2008) Leaves of *Citrus aurantifolia* exhibit a different sensibility to solar UV-B radiation according to development stage in relation to photosynthetic pigments and UV-B absorbing compounds production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **90**: 163–169
- Izaguirre MM, Scopel AL, Baldwin IT, Ballaré CL** (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* **132**: 1755–1767
- Izaguirre MM, Mazza CA, Biondini M, Baldwin IT, Ballaré CL** (2006) Remote sensing of future competitors: Impacts on plant defenses. **103**: 7170–7174
- Izaguirre MM, Mazza CA, Svatos A, Baldwin IT, Ballaré CL** (2007) Solar Ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. *Annals of Botany* **99**: 103–109

- Jassbi AR, Gase K, Hettenhausen C, Schmidt A, Baldwin IT** (2008) Silencing geranylgeranyl diphosphate synthase in *Nicotiana attenuata* dramatically impairs resistance to tobacco hornworm. *Plant Physiology* **146**: 974–986
- Jenkins GI** (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 407–431
- Johnson ET, Dowd PF** (2004) Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 5135–5138
- Jones P, Messner B, Nakajima J-I, Schäffner AR, Saito K** (2003) UGT73C6 and UGT78D1, Glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 43910–43918
- Kaur H, Heinzl N, Schöttner M, Baldwin IT, Gális I** (2010) R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **152**: 1731–1747
- Keinänen M, Oldham NJ, Baldwin IT** (2001) Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3553–3558
- Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT** (2004) Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* **305**: 665–668
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal* **50**: 347–363
- Kim BC, Tennessen DJ, Last RL** (1998) UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **15**: 667–674

- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J** (2006) Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. *Plant Science* **170**: 715–723
- Klee HJ** (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**: 660–667
- Kliebenstein DJ, Figuth A, Mitchell-Olds T** (2002a) Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**: 1685–1696
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL** (2002b) *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to Human Regulator of Chromatin Condensation 1. *Plant Physiology* **130**: 234–243
- Kliebenstein DJ** (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment* **27**: 675–684
- Kliebenstein DJ, Rowe HC, Denby KJ** (2005) Secondary metabolites influence *Arabidopsis*/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* **44**: 25–36
- Krizek DT, Britz SJ, Mirecki RM** (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia Plantarum* **103**: 1–7
- Krügel T, Lim M, Gase K, Halitschke R, Baldwin IT** (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana attenuata*, a model ecological expression system. *Chemoecology* **12**: 177–183
- Kucera B, Leubner-Metzger G, Wellmann E** (2003) Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with β -1,3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. *Plant Physiology* **133**: 1445–1452
- Kuhlmann F, Müller C** (2009) Development-dependent effects of UV radiation exposure on broccoli plants and interactions with herbivorous insects. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 61–68

- Kuhlmann F, Müller C** (2011) Impacts of ultraviolet radiation on interactions between plants and herbivorous insects: a chemo-ecological perspective. *In* UE Lüttge, W Beyschlag, B Büdel, D Francis, eds, Springer Berlin Heidelberg, pp 305–347
- Laluk K, Mengiste T** (2010) Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *The Arabidopsis Book* e0136
- Landry LG, Chapple CCS, Last RL** (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced Ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* **109**: 1159–1166
- Lavola A, Julkunen-Tiitto R, Roininen H, Aphalo P** (1998) Host-plant preference of an insect herbivore mediated by UV-B and CO₂ in relation to plant secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**: 1–12
- Łaźniewska J, Macioszek V, Lawrence C, Kononowicz A** (2010) Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* **32**: 1–10
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C** (2000) Cloning of the SNG1 gene of arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *The Plant Cell Online* **12**: 1295–1306
- Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL** (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. *Plant Physiology* **150**: 1567–1575
- Leitner M, Boland W, Mithöfer A** (2005) Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **167**: 597–606
- Leyser HMO** (1998) Plant hormones. *Current Biology* **8**: R5–R7
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell Online* **5**: 171–179

- Li L, Steffens J** (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**: 239–247
- Lindroth RL, Hofman RW, Campbell BD, McNabb WC, Hunt DY** (2000) Population differences in *Trifolium repens*; L. response to ultraviolet-B radiation: foliar chemistry and consequences for two lepidopteran herbivores. *Oecologia* **122**: 20–28
- Liu F, Jiang H, Ye S, Chen W-P, Liang W, Xu Y, Sun B, Sun J, Wang Q, Cohen JD, Li C** (2010) The Arabidopsis P450 protein CYP82C2 modulates jasmonate-induced root growth inhibition, defense gene expression and indole glucosinolate biosynthesis. *Cell Research* **20**: 539–552
- Lou Y, Baldwin IT** (2003) *Manduca sexta* recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14581–14586
- Lloyd AJ, William Allwood J, Winder CL, Dunn WB, Heald JK, Cristescu SM, Sivakumaran A, Harren FJM, Mulema J, Denby K, Goodacre R, Smith AR, Mur LA** (2011) Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal* **67**: 852–868
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **16**: 1938–1950
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell Online* **15**: 165–178
- A.-H.-Mackerness S, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B** (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by

jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1413–1423

Maffei M, Scannerini S (2000) UV-B effect on photomorphogenesis and essential oil composition in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Essential Oil Research* **12**: 523–529

Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, Romero MF, Rivas EI, Gárriz A, Ruiz OA, Pieckenstein FL (2008) Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* **147**: 2164–2178

Mazza CA, Zavala J, Scopel AL, Ballaré CL (1999) Perception of solar UVB radiation by phytophagous insects: Behavioral responses and ecosystem implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 980–985

Mazza CA, Boccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* **122**: 117–126

Mazza CA, Izaguirre MM, Zavala J, Scopel AL, Ballaré CL (2002) Insect perception of ambient ultraviolet-B radiation. *Ecology Letters* **5**: 722–726

Mazza CA, Izaguirre MM, Curiale J, L. BC (2010) A look into the invisible: ultraviolet-B sensitivity in an insect (*Caliothrips phaseoli*) revealed through a behavioural action spectrum. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 367–373

McCloud ES, Berenbaum MR (1994) Stratospheric ozone depletion and plant insect interactions: Effects of UVB radiation on foliage quality of *Citrus jambhiri* for *Trichoplusia ni*. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 525–539

- Mert-Turk F, Bennett M, Mansfield J, Holub E** (2003) Quantification of camalexin in several accessions *Arabidopsis thaliana* following inductions with *Peronospora parasitica* and UV-B irradiation. *Phytoparasitica* **31**: 81–89
- Mewis I, Appel HM, Hom A, Raina R, Schultz JC** (2005) Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology* **138**: 1149–1162
- Mewis I, Schreiner M, Nguyen CN, Krumbein A, Ulrichs C, Lohse M, Zrenner R** (2012) UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1546–1560
- Mewis I, Tokuhisa JG, Schultz JC, Appel HM, Ulrichs C, Gershenzon J** (2006) Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry* **67**: 2450–2462
- Meyer K, Cusumano JC, Somerville C, Chapple CC** (1996) Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 6869–6874
- Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA** (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 33712–33717
- Mikkelsen MD, Petersen BL, Glawischnig E, Jensen AB, Andreasson E, Halkier BA** (2003) Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology* **131**: 298–308
- Moreno JE, Tao Y, Chory J, Ballaré CL** (2009) Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 4935–4940

- Oerke EC** (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Sciences* **144**: 31–43
- Oh Y, Baldwin IT, Gális I** (2012) NaJAZh regulates a subset of defense responses against herbivores and spontaneous leaf necrosis in *Nicotiana attenuata* plants. *Plant Physiology* **159**: 769–788
- Olsson LC, Veit M, Bornman JF** (1999) Epidermal transmittance and phenolic composition in leaves of atrazine-tolerant and atrazine-sensitive cultivars of *Brassica napus* grown under enhanced UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* **107**: 259–266
- Onkokesung N, Gaquerel E, Kotkar H, Kaur H, Baldwin IT, Galis I** (2012) MYB8 controls inducible phenolamide levels by activating three novel hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: polyamine transferases in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **158**: 389–407
- Oravecz A, Baumann A, Máté Z, Brzezinska A, Molinier J, Oakeley EJ, Ádám É, Schäfer E, Nagy F, Ulm R** (2006) CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **18**: 1975–1990
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Perez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, García-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788–791
- Pandey SP, Baldwin IT** (2008) Silencing RNA-directed RNA polymerase 2 increases the susceptibility of *Nicotiana attenuata* to UV in the field and in the glasshouse. *The Plant Journal* **54**: 845–862
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT** (2007) Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal* **51**: 79–91

- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS** (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 536–548
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell Online* **8**: 2309–2323
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Schenk PM, Van den Ackerveken G, Cammue BPA, Thomma BPHJ** (2003) The *Arabidopsis* mutant *iop1* exhibits induced over-expression of the plant defensin gene PDF1.2 and enhanced pathogen resistance. *Molecular Plant Pathology* **4**: 479–486
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **10**: 2103–2113
- Pluskota WE, Qu N, Maitrejean M, Boland W, Baldwin IT** (2007) Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4071–4082
- Quentin M, Allasia V, Pegard A, Allais F, Ducrot P-H, Favery B, Levis C, Martinet S, Masur C, Ponchet M, Roby D, Schlaich N, Jouanin L, Keller H** (2009) Imbalanced lignin biosynthesis promotes the sexual reproduction of homothallic oomycete pathogens. *PLoS Pathogens* **5**: e1000264
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W** (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 1051–1071
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125–136

- Reuber S, Bornman JF, Weissenböck G** (1996) Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* **97**: 160–168
- Rizzini L, Favory J-J, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R** (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* **332**: 103–106
- Roberts MR, Paul ND** (2006) Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist* **170**: 677–699
- Robson F, Okamoto H, Patrick E, Harris S-R, Wasternack C, Brearley C, Turner JG** (2010) Jasmonate and phytochrome A signaling in *Arabidopsis* wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability. *The Plant Cell Online* **22**: 1143–1160
- Roda AL, Oldham NJ, Svatos A, Baldwin IT** (2003) Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *Phytochemistry* **62**: 527–536
- Rousseaux MC, Ballaré CL, Scopel AL, Searles PS, Caldwell MM** (1998) Solar ultraviolet-B radiation affects plant-insect interactions in a natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Oecologia* **116**: 528–535
- Rousseaux MC, Julkunen-Tiitto R, Searles P, Scopel A, Aphalo P, Ballaré C** (2004) Solar UV-B radiation affects leaf quality and insect herbivory in the southern beech tree *Nothofagus antarctica*. *Oecologia* **138**: 505–512
- Rowe HC, Walley JW, Corwin J, Chan EK-F, Dehesh K, Kliebenstein DJ** (2010) Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. *PLoS Pathogens* **6**: e1000861
- Ruegger M, Chapple C** (2001) Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics* **159**: 1741–1749

- Ruegger M, Meyer K, Cusumano JC, Chapple C** (1999) Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in Arabidopsis in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiology* **119**: 101–110
- Ryan KG, Markham KR, Bloor SJ, Bradley JM, Mitchell KA, Jordan BR** (1998) UVB radiation induced increase in quercetin: kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of Petunia. *Photochemistry and Photobiology* **68**: 323–330
- Searles P, Flint S, Caldwell M** (2001) A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* **127**: 1–10
- Schenke D, Böttcher C, Scheel D** (2011) Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in Arabidopsis prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production. *Plant, Cell and Environment* **34**: 1849–1864
- Schlaepi K, Abou-Mansour E, Buchala A, Mauch F** (2010) Disease resistance of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *The Plant Journal* **62**: 840–851
- Schlaepi K, Mauch F** (2010) Indolic secondary metabolites protect Arabidopsis from the oomycete pathogen *Phytophthora brassicae*. *Plant Signaling and Behavior* **5**: 1099–1101
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatoš A, Halkier BA, Glawischnig E** (2006) CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiology* **141**: 1248–1254
- Schumacher J, Tudzynski P** (2012) Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. In J Pérez-Martín, A Di Pietro, eds, Springer Berlin / Heidelberg, pp 225–241
- Simmonds MSJ** (2003) Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* **64**: 21–30
- Stamp NE, Osier TL** (1998) Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **88**: 81–96

- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal Jasmonic Acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **16**: 2117–2127
- Steppuhn A, Gase K, Krock B, Halitschke R, Baldwin IT** (2004) Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biol* **2**: e217
- Stratmann JW, Stelmach BA, Weiler EW, Ryan CA** (2000) UVB/UVA radiation activates a 48 kDa myelin basic protein kinase and potentiates wound signaling in tomato leaves. *Photochemistry and Photobiology* **71**: 116–123
- Stratmann J** (2003) Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends in Plant Science* **8**: 526–533
- Takahashi M, Teranishi M, Ishida H, Kawasaki J, Takeuchi A, Yamaya T, Watanabe M, Makino A, Hidema J** (2011) Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *The Plant Journal* **66**: 433–442
- Tegelberg R, Julkunen-Tiitto R, Aphalo PJ** (2001) The effects of long-term elevated UV-B on the growth and phenolics of field-grown silver birch (*Betula pendula*). *Global Change Biology* **7**: 839–848
- Tegelberg R, Julkunen-Tiitto R, Aphalo PJ** (2004) Red: far-red light ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1005–1013
- Teramura AH, Sullivan JH, Ziska LH** (1990) Interaction of elevated Ultraviolet-B radiation and CO₂ on productivity and photosynthetic characteristics in Wheat, Rice, and Soybean. *Plant Physiology* **94**: 470–475
- Terry LA, Joyce DC, Adikaram NKB, Khambay BPS** (2004) Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* **31**: 201–212

- Textor S, Gershenzon J** (2009) Herbivore induction of the glucosinolate–myrosinase defense system: major trends, biochemical bases and ecological significance. *Phytochemistry Reviews* **8**: 149–170
- The Arabidopsis Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815
- Treutter D** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* **4**: 147–157
- Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Ádám É, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F** (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1397–1402
- Wargent JJ, Gegas VC, Jenkins GI, Doonan JH, Paul ND** (2009) UVR8 in *Arabidopsis thaliana* regulates multiple aspects of cellular differentiation during leaf development in response to ultraviolet B radiation. *New Phytologist* **183**: 315–326
- Wittstock U, Kliebenstein DJ, Lambrix V, Reichelt M, Gershenzon J** (2003) Chapter five Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *In* JTRBT-RA in *Phytochemistry*, ed, Integrative *Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology*. Elsevier, pp 101–125
- Wu J, Hettenhausen C, Schuman MC, Baldwin IT** (2008) A comparison of two *Nicotiana attenuata* accessions reveals large differences in signaling induced by oral secretions of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Plant Physiology* **146**: 927–939
- Wurms KV, George MP, Lauren DR** (2003) Involvement of phenolic compounds in host resistance against *Botrytis cinerea* in leaves of the two commercially important kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*) cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **31**: 221–233

- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE** (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell Online* **19**: 2470–2483
- Zavala JA, Scopel AL, Ballaré CL** (2001) Effects of ambient UV-B radiation on soybean crops: Impact on leaf herbivory by *Anticarsia gemmatilis*. *Plant Ecology* **156**: 121–130
- Zavala J, Baldwin I** (2004) Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecology* **4**: 11
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Baldwin IT** (2004) Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness cost in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1607–1612
- Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development* **16**: 3100–3112
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Read JJ, Sullivan JH** (2003) Growth and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to elevated carbon dioxide and ultraviolet-B radiation under controlled environmental conditions. *Plant, Cell and Environment* **26**: 771–782